

**Die Expression antimikrobieller Peptide  
(Psoriasin, HBD-2 und HBD-3)  
in menschlicher Haut und deren Modulation in vivo -  
eine Untersuchung im xenogenen Haut-Transplantationsmodell**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von: Carl-Philipp Stavros Bürkle  
geb. am 09.05.1980 in Waldkirch

angefertigt in der: Abteilung für experimentelle Dermatologie  
an der Klinik für Dermatologie, Venerologie und  
Allergologie der Universität Leipzig

betreut von: Prof. Dr. med. Michael Sticherling

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom 23. August 2011









**Die Expression antimikrobieller Peptide  
(Psoriasin, HBD-2 und HBD-3)  
in menschlicher Haut und deren Modulation in vivo -  
eine Untersuchung im xenogenen Haut-Transplantationsmodell**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von: Carl-Philipp Stavros Bürkle  
geb. am 09.05.1980 in Waldkirch

angefertigt in der: Abteilung für experimentelle Dermatologie  
an der Klinik für Dermatologie, Venerologie und  
Allergologie der Universität Leipzig

betreut von: Prof. Dr. med. Michael Sticherling

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom 23. August 2011



# **INHALTSVERZEICHNIS**

**I**

Bibliographische Beschreibung	V
Abkürzungsverzeichnis	VI

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Die Haut - an der Grenze zur Umwelt	1
1.2	Die Haut - ein Schutz gegen die Umwelt (Abwehrsysteme)	3
1.2.1	Physikalisches Schutzschild	3
1.2.2	Chemisches Schutzschild	3
1.3	Antimikrobielle Peptide und Proteine	5
1.3.1	Die Entdeckung der antimikrobiellen Peptide	5
1.3.2	Eigenschaften und Funktionsweise von antimikrobiellen Peptiden	6
1.3.3	Ausgewählte antimikrobielle Peptide beim Menschen	9
1.3.3.1	Defensine	9
1.3.3.1.1	Humanes- $\beta$ -Defensin 1 (HBD-1)	9
1.3.3.1.2	Humanes- $\beta$ -Defensin 2 (HBD-2)	9
1.3.3.1.3	Humanes- $\beta$ -Defensin 3 (HBD-3)	10
1.3.3.1.4	Humanes- $\beta$ -Defensin 4 (HBD-4)	11
1.3.3.2	Psoriasin	11
1.4	Warum zeigen Psoriatiker weniger bakterielle Superinfektionen der Haut als Neurodermitiker?	12
<b>2</b>	<b>AUFGABENSTELLUNG</b>	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALIEN UND METHODEN</b>	<b>17</b>
3.1	Material	17
3.1.1	Versuchstiere	17
3.1.2	Transplantation	17
3.1.3	Modulation mit Zytokinen	19
3.1.4	Probenaufarbeitung	20
3.1.5	Immunhistochemischer Nachweis (IHC)	20
3.1.6	In-situ-Hybridisierung (ISH)	21

3.1.7	Mikroskopieren und Fotodokumentation	23
3.1.8	Sonstiges Laborgerät und sonstiger Laborbedarf	24
3.2	Methoden	24
3.2.1	Tierversuchsvorhaben	24
3.2.2	Transplantation	25
3.2.3	Modulation mit Zytokinen	27
3.2.4	Probenentnahme	27
3.2.5	Immunhistochemischer Nachweis (IHC)	28
3.2.6	Herstellung von Plasmiden und RNA-Sonden	29
3.2.7	In-situ-Hybridisierung (ISH)	30
3.2.8	Fotografische Dokumentation und Auswertung	32
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	35
4.1	Das xenogene in vivo Maus-Transplantationsmodell	35
4.2	Der Nachweis antibiotischer Peptide in der Spenderhaut vor Transplantation	38
4.2.1	In-situ-Hybridisierung (ISH)	38
4.2.2	Immunhistochemischer Nachweis (IHC)	39
4.3	Der Nachweis antibiotischer Peptide in der Spenderhaut nach Transplantation	41
4.3.1	In-situ-Hybridisierung (ISH)	41
4.3.2	Immunhistochemischer Nachweis (IHC)	42
4.4	Die Expression antibiotischer Peptide in der Spenderhaut vor und nach Transplantation im Vergleich	43
4.5	Die Modulation der Expression antimikrobieller Peptide durch Zytokine	44
4.5.1	TNF- $\alpha$	44
4.5.1.1	In-situ-Hybridisierung (ISH)	44
4.5.1.2	Immunhistochemischer Nachweis (IHC)	49
4.5.2	IFN- $\gamma$	54
4.5.2.1	In-situ-Hybridisierung (ISH)	54
4.5.2.2	Immunhistochemischer Nachweis (IHC)	58
4.5.3	Zusammenschau nach Injektion mit TNF- $\alpha$ und IFN- $\gamma$	61

4.5.4	TNF- $\alpha$ und IFN- $\gamma$ in Kombination	63
4.5.5	TNF- $\alpha$ und IL-13 in Kombination	63
4.5.6	Fotografische Dokumentation des Nachweises mittels in-situ-Hybridisierung (ISH)	64
4.5.7	Fotografische Dokumentation des Nachweises mittels Immunhistochemischer Methode (IHC)	66
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	69
5.1	Ist das xenogene SCID-Maus-Transplantationsmodell für die in-vivo-Studie antibiotischer Peptide geeignet?	71
5.2	Der Nachweis antibiotischer Peptide in der Spenderhaut vor und nach Transplantation	72
5.3	Führt die Injektion von Zytokinen zu einer veränderten Expression von antibiotischen Peptiden im Transplantat?	74
5.3.1	Psoriasin nach Injektion von TNF- $\alpha$ und IFN- $\gamma$	76
5.3.2	HBD-2 nach Injektion von TNF- $\alpha$ und IFN- $\gamma$	77
5.3.3	HBD-3 nach Injektion von TNF- $\alpha$ und IFN- $\gamma$	78
5.3.4	HBD-2 und HBD-3 nach Injektion von Zytokinkombinationen	79
5.4	Fazit	79
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	81
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	85
<b>8</b>	<b>ANLAGEN</b>	93
	Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit	IX
	Lebenslauf	X
	Danksagung	XII



Bibliographische Beschreibung:

Bürkle, Carl-Philipp Stavros

**Die Expression antimikrobieller Peptide (Psoriasin, HBD-2 und HBD-3) in menschlicher Haut und deren Modulation in vivo - eine Untersuchung im xenogenen Haut-Transplantationsmodell**

Universität Leipzig, Dissertation

96 S.<sup>1</sup>, 59 Lit.<sup>2</sup>, 35 Abb., 22 Tab., 4 Anlagen

Referat:

In der humanen Haut spielen antimikrobielle Peptide (AP) bei Entzündungsgeschehen bakteriellen und nicht-bakteriellen Ursprungs eine bedeutende Rolle. Neben einer konstitutiven Expression AP können Zytokine deren vermehrte oder abgeschwächte Expression bewirken. In dieser Arbeit wurden die AP humanes  $\beta$ -Defensin (HBD) -2, HBD-3 und Psoriasin (PSO) in Bezug auf deren Expression in gesunder Haut und deren Modulation durch Zytokine in vivo anhand des xenogenen NOD-SCID-Maus-Transplantationsmodells untersucht. Nach erfolgreicher Transplantation von humaner Haut auf NOD-SCID Mäuse wurden die Zytokine TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-13 in unterschiedlicher Dosierung einzeln und in Kombination intradermal appliziert. Für TNF- $\alpha$  konnte eine erhöhte Expression von HBD-2, HBD-3 und PSO auf RNA-Ebene mittels in-situ-Hybridisierung und Protein-Ebene mittels immunhistochemischer Nachweismethoden gezeigt werden. Eine erhöhte Expression nach Injektion von IFN- $\gamma$  ließ sich für HBD-3 auf RNA-Ebene und Protein-Ebene und für HBD-2 auf RNA-Ebene erfolgreich belegen. PSO zeigte auf Protein-Ebene nach Modulation mit IFN- $\gamma$  eine bei höherer Dosierung leicht abnehmende Expression. Eine Änderung der Expression durch IL-13 ließ sich nicht eindeutig belegen. In dieser Arbeit konnte die in der Literatur in vitro beschriebene Modulationsfähigkeit der untersuchten AP durch die verwendeten Zytokine in vivo belegt werden.

---

<sup>1</sup> Seitenzahl insgesamt, <sup>2</sup> Zahl der im Literaturverzeichnis ausgewiesenen Literaturangaben

## **ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

AD	Atopische Dermatitis / Atopisches Ekzem
AIDS	Acquired immune deficiency syndrom
AP	Antibiotisches Peptid / antimikrobielles Peptid
bp	Basenpaar
Ca	Carcinom
CD	Cluster of Differentiation (CD4/CD8)
cDNA	complementary Desoxyribonuklein Acid / -säure
DCIS	ductales Carcinoma in situ
ELISA	Enyme-linked Immunosorbent Assay
HBD-1-3	humanes beta-Defensin 1-3
hebr.	hebräisch
HI-Virus	Humanes-Immundefizienzvirus (HIV)
IFN-	Interferon-
IGF-	Insulin-like growth factor
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
ISH	in-situ-Hybridisierung
Kap.	Kapitel
lat.	lateinisch
LE	Lupus erythematodes
li	links
LL-37	humanes antibiotisches Peptid aus der Familie der Cathelicidine
LM	Lentigo maligna
m	männlich
NaCl	Natrium-Chlorid
NH	normale (menschliche) Haut
NOD	Non obese diabetic
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
PS	Psoriasis
PSO	Psoriasin
VI	



re	rechts
RNA/-S	Ribonuclein Acid / -säure
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SCID	Severe combined immunodeficiency
SSM	superfiziell spreitendes Melanom
Str.	Stratum
TLRs	Toll-like Rezeptoren
TNF-	Tumor-Nekrose-Faktor-
TGF-	Transforming-growth-factor-
w	weiblich



# 1 EINLEITUNG

Kapitel (Kap.) 1.1 beschreibt den Aufbau und die Eigenschaften der menschlichen Haut, insbesondere in der Rolle als Begrenzung unseres Körpers zur Umwelt. Anschließend werden die unterschiedlichen Schutzfunktionen dargestellt (Kap. 1.2 und 1.3). Nach einer ausführlichen Darstellung der bedeutsamen Rolle antimikrobieller Peptide (Kap. 1.3) folgt die Besprechung anhand zweier klinisch bedeutender Krankheitsbilder (Kap. 1.4).

## 1.1 Die Haut - an der Grenze zur Umwelt

Die Haut bildet die äußere Grenzfläche des menschlichen Körpers zur Umwelt. Mit einer Gesamtfläche im Erwachsenenalter von 1,6 - 2 m<sup>2</sup>, einer Dicke von 1,5 - 4 mm, einem Gewicht von 10 - 12 kg und einer Gesamtzahl von bis zu 2 Mrd. Zellen ist sie das größte Organ des menschlichen Organismus.

Stetig steht sie unter mechanischer Beanspruchung, schützt den Körper vor Austrocknung, dient als Schutzschild vor potentiellen Pathogenen, empfängt als Sensor Informationen über Berührungs-, Druck-, Temperatur- und Schmerzempfinden, ist aktiv an der Thermoregulation beteiligt und spielt im Rahmen der psychosozialen Kommunikation eine bedeutende Rolle.

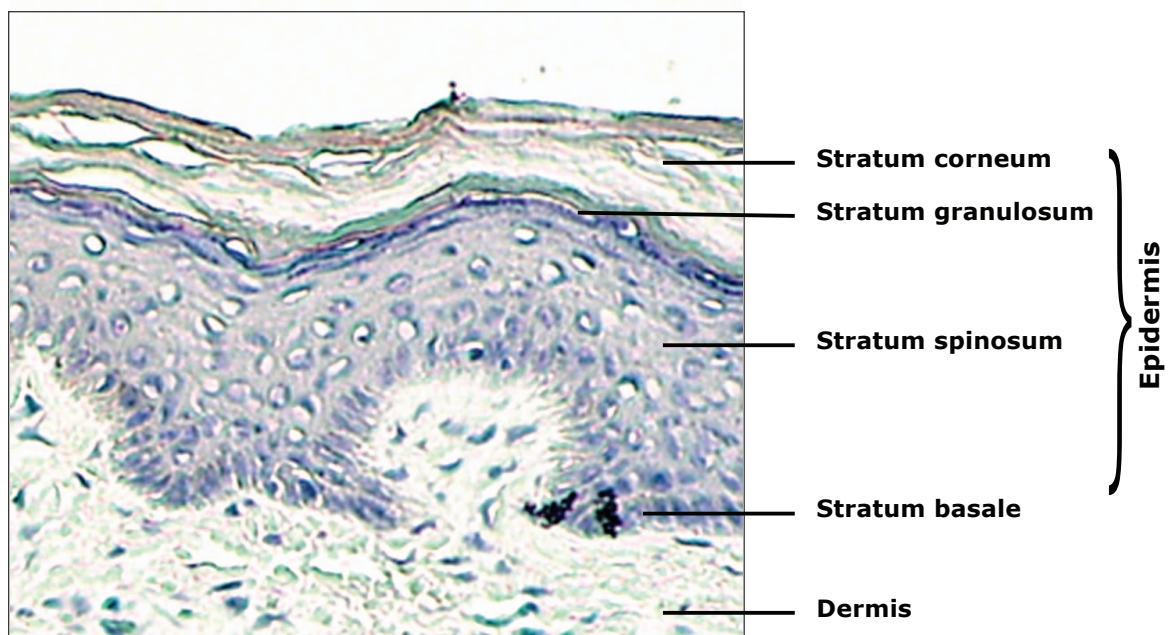


Abb. 1 Histologisches Bild der menschlichen Haut mit den unterschiedlichen Schichten der Epidermis

Das Hautorgan ist durch einen mehrschichtigen Aufbau charakterisiert. Es lassen sich drei Hauptschichten unterscheiden:

- a) *Epidermis (Oberhaut)*: mehrschichtiges, verhornendes Plattenepithel
  - b) *Dermis (Korium)*: faserreiches Bindegewebe
  - c) *Subkutis (Unterhaut)*: subkutanes Fettgewebe
- } Kutis

Histologisch unterteilt sich die Epidermis (von innen nach außen) in Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum (s. Abb. 1).

Die Epidermis ist gefäßlos und befindet sich in ständiger Erneuerung. Die sich mitotisch teilenden Keratinozyten des Stratum basale (Stratum germinativum) differenzieren sich in den suprabasal gelegenen Schichten und erscheinen an der Oberfläche schließlich als Hornzellen (Korneozyten). Die dominierenden Zellen der Dermis sind die Fibroblasten. Diese bilden das aus gebündelten Kollagenfasern und netzartig angeordneten elastischen Fasern bestehende dermale Bindegewebe. Fettzellen (Lipozyten) und Bindegewebe sind die Hauptbestandteile der Subkutis.

Eine weitere Eigenschaft der Haut ist ihre residente Hautflora. Diese besteht aus mikrobiellen Kommensalen, die in den äußeren Epidermisschichten und im Stratum corneum leben (Noble 1989). Hinzu kommt die transiente Hautflora. Hier werden im Kontakt zur Umwelt kontinuierlich weitere potentiell pathogene mikrobielle Erreger von außen an das Hautorgan herangetragen. Bei einer Verdoppelungszeit mancher Mikroorganismen von 20 Minuten unter optimalen Wachstumsbedingungen (Feuchtigkeit, Nährstoffangebot, Temperatur) wäre eigentlich zu erwarten, dass die Oberfläche der Haut exzessiv von Mikroorganismen überwuchert wird. Ebenso wäre bei einer stetig zunehmenden Bakterienlast mit dem gehäuften Auftreten von Infektionen zu rechnen. Das Gegenteil ist der Fall: Die Populationsdichte der residenten Hautflora bewegt sich in Abhängigkeit von der Lokalisation relativ konstant zwischen  $10^2$  und  $10^7$  Mikroorganismen/cm<sup>2</sup> (Schröder 2002) und Infektionen der Haut treten im Normalfall selten auf. Von Bedeutung ist, dass die Bakterien auf der Oberfläche von Haut und Schleimhaut, also außerhalb unseres Körpers leben. Hier besiedeln sie Nase, Ohren, Mund und Darm. Sobald die Bakterien ihren fest definierten Aufenthaltsbereich verlassen und durch die Haut in den Organismus eindringen, drohen Infektionen. Sowohl bei kleineren Hautdefekten wie

z.B. beim Erysipel als auch bei großflächiger Schädigung der Haut wie z.B. bei Verbrennungspatienten oder einer toxisch epidermalen Nekrolyse, einer meist medikamentös induzierten Nekrose der gesamten Epidermis, kann dies zu einer Bakteriämie und zu einer lebensbedrohlichen Sepsis führen.

## **1.2 Die Haut - ein Schutz gegen die Umwelt (Abwehrsysteme)**

Zur Aufrechterhaltung eines solchen relativen Gleichgewichtes und der Bekämpfung unphysiologischer Belastungen durch mikrobielle Erreger steht dem Hautorgan eine Vielzahl von Effektorsystemen zur Verfügung.

### **1.2.1 Physikalisches Schutzschild**

Eine bedeutende Rolle kommt der physikalischen Schutzfunktion der Haut zu. Diese wird in der gesunden Haut vom Stratum corneum und im Bereich der Schleimhäute von der Muzinschicht erfüllt. Durch Zellerneuerung mit folgender Desquamation und Absonderung von Schleim entsteht stetig eine neue Oberfläche, woraus eine kontinuierliche Entfernung der anhaftenden Mikroorganismen resultiert. Zusätzlich wird die physikalische Barriere durch einen sauren Oberflächenfilm (pH 5 – 5,5) und eine ausgeprägte Lipidbarriere gestützt. Das Intaktsein dieses physikalischen Schutzschildes ist für eine effektive Infektionsabwehr grundsätzlich notwendig, jedoch kommen noch weitere Abwehrmechanismen hinzu.

### **1.2.2 Chemisches Schutzschild**

Neben der physikalischen Schutzfunktion stehen der Haut für eine effektive Abwehr pathogener Mikroorganismen eine Vielzahl spezialisierter Effektormoleküle des angeborenen (innate immune system) und des erworbenen (adaptive immune system) Immunsystems zur Verfügung.

Den Bestandteilen des angeborenen Immunsystems kommt eine besondere Bedeutung zu, da es die erste Barriere gegen pathogene Einflüsse darstellt und zeitlich wie räumlich vor dem adaptiven Immunsystem steht (Fearon et al. 1996). Es besteht überwiegend aus Makrophagen und neutrophile Granulozyten (Phagozyten). Diese sezernieren, neben proteolytischen und Sauerstoffradikale produzierenden Enzymen, vor allem antimikrobielle Peptide und Proteine wie die sogenannten  $\alpha$ -Defensine, Protegrine, Cathelicidine und Lysozym (Schröder 2002). Mittels Toll-like-Rezeptoren (TLRs) gelingt es den Akteuren des angeborenen Immunsystems eingedrungene Mikroorganismen zu identifizieren und von körpereigenen Zellen zu unterscheiden. Die TLRs erkennen dem Mikroorganismus eigene unveränderliche Merkmale, sogenannte pathogen-assoziierte molekulare Muster (engl. Pathogen-associated molecular patterns, PAMP).

Das erworbene Immunsystem hat die Möglichkeit, durch antigenspezifische Antikörper eine gezielte, auf den eindringenden Mikroorganismus angepasste Abwehr durchzuführen und ein immunologisches Gedächtnis (Memoryzellen) anzulegen. Jedoch benötigt es zur maximalen Entfaltung seiner Aktivität Tage bis Wochen.

	<b>Angeborenes Immunsystem</b>	<b>Erworbenes Immunsystem</b>
<i>Spezifität</i>	breit	eng (antigenspezifisch)
<i>Kinetik</i>	sofort	wenige Tage bis Wochen
<i>Komponenten</i>	zellulär und humoral	zellulär und humoral
<i>Vorkommen</i>	in fast allen Organismen	Vertebraten
<i>Gedächtnis</i>	nein (PAMP)	ja (Memoryzellen)

Tab. 1 Gegenüberstellung von angeborenem und erworbenem Immunsystem

Mit dem angeborenen und erworbenen Immunsystem besitzen Wirbeltiere die Fähigkeit, erregerspezifisch auf in den Körper eingedrungene Mikroorganismen zu reagieren. Bei beiden Systemen wird eine humorale (lat.: *humor* = Flüssigkeit) und eine zelluläre Komponente unterschieden. Beim Menschen gehören zur zellulären Komponente eosinophile Granulozyten (z.B. Parasitenabwehr), neutrophile Granulozyten (z.B. Bakterien- und Pilzabwehr), Makrophagen (Phagozytose und Antigenpräsentation), natürliche Killerzellen (bei Virusbefall und Tumorerkrankungen), B-Lymphozyten (Antikörperproduktion) und T-Helferzellen (Koordination durch TH1 - Zellen: Verstärkung der Immunantwort und TH2 - Zellen:

Aktivierung Antikörperproduktion), zytotoxische T-Zelle (Zellzerstörung durch Lyse). Die humorale Komponente beinhaltet z.B. Lysozym, Zytokine, das Komplementsystem, das LPS-(Lipopolysaccharide-)bindende Protein, antimikrobielle Peptide (Beutler et al. 2005) und Immunglobuline.

Die humoralen und zellulären Bestandteile des Immunsystems zirkulieren normalerweise in Blut- und Lymphgefäßen und sind somit nur an der Hautoberfläche nachweisbar, sobald diese verletzt ist, beispielsweise das Auftreten von neutrophilen Granulozyten bei einer eiternden Wunde. Das äußerst seltene Auftreten von Infektionen auf gesunder unverletzter Haut und die Regulierung der residenten Hautflora können durch die an die Blut- und Lymphwege gebundenen Zellen nicht erklärt werden. Diese Zusammenhänge lassen vermuten, dass für die Haut ein spezifisches ortsständiges Abwehrsystem existiert.

### **1.3 Antimikrobielle Peptide und Proteine**

#### **1.3.1 Die Entdeckung der antimikrobiellen Peptide**

Die Körperoberfläche sämtlicher mehrzelliger Organismen wird von Mikroorganismen besiedelt. Dazu gehören auch Invertebraten, z.B. Insekten, die nur ein primitives zelluläres Immunsystem aufweisen, und Pflanzen, die kein zelluläres Immunsystem besitzen. 1987 entdeckte M. Zasloff (1987) die Gruppe der Magainine (hebr.: *magen* = Schutzschild). Dies sind konstitutionell von Schleimdrüsen der Froschhaut produzierte Peptide, die eine breite antimikrobielle Wirkung gegen grampositive und -negative Bakterien, Pilze und Protozoen besitzen. Mit der Entdeckung der Magainine liegt ein Nachweis für die Existenz eines maßgeblich durch antimikrobielle Peptide gestützten hautspezifischen chemischen Schutzschildes bei Amphibien vor.

Der Entdeckung der antimikrobiell wirksamen Magainine in der Froschhaut folgte die Entdeckung weiterer antibiotischer Peptide (AP). Diese blieben nicht auf die Amphibien beschränkt, sondern ließen sich in vielen Invertebraten, Vertebraten und auch beim Menschen nachweisen. Bislang wurden auf Ebene der Bakterien bis hin zum Menschen über 800 antimikrobielle Peptide nachgewiesen (Steinstraesser et al. 2004).

Ein weiterer wichtiger Meilenstein in der Entdeckung der AP wurde 1981 von H. Steiner et al. (1981) gesetzt: Ihm gelang die Induktion eines AP. Nach Injektion von Bakterien in die Seidenraupe (*Hyalophora cecropia*) konnte die Neusynthese des AP Cecropin A nachgewiesen werden. Cecropin A zeigte eine antibakterielle Wirksamkeit gegen gramnegative Bakterien (*E. coli*, *B. subtilis*, *S. marcescens* und *P. aeruginosa*). 1984 erfolgte der Nachweis der ersten Defensine in Granulozyten vom Hasen und Menschen (Selsted et al. 1984, 1985).

### 1.3.2 Eigenschaften und Funktionsweise von antimikrobiellen Peptiden

Vielen AP ist eine amphipatische Struktur gemeinsam, d. h. das Vorkommen von hydrophoben und hydrophilen Aminosäuren in bestimmten Bereichen der Peptidkette. Zusätzlich weist die Mehrzahl der AP einen hohen Anteil basischer Aminosäuren (z.B. Arginin oder Lysin) auf, wodurch sie unter physiologischer Bedingung kationische Eigenschaften besitzen. Trotz dieser gemeinsamen Charakteristika weist der dreidimensionale Aufbau unterschiedlicher AP erhebliche Unterschiede auf (s. Tab 2). Neben linearen Peptiden, die beim Angriff auf eine Membran eine  $\alpha$ -helikale Struktur einnehmen (z.B. Cecropin und Magainin), gibt es lineare AP, die bei einer Membran-Attacke ihre Struktur beibehalten (z.B. PR-39). Außerdem gibt es AP, die eine relativ rigide  $\beta$ -Faltblattstruktur aufweisen, die durch Disulfidbrücken (S-S) gewährleistet wird (z.B. Bactenectin und Defensine).

Klasse	Beispiele
linear, $\alpha$ -helikale Struktur	Cecropin A, Magainin 2, Pexiganan, Dermaseptin 1, LL-37, Buforin II
linear, nicht $\alpha$ -helikal	Bac-5, PR-39, Indolicidin, Apidaecin, Phyrhocoricin, Histatin
eine Disulfidbrücke (S-S)	Bacnectin, Thanatin, Brevinin 1T, Ranalexin, Ranateurin 1, Esculetin 1
Zwei S-S-Brücken	Tachyplesin, Androctonin, Protegrin
drei S-S-Brücken	$\alpha$ -Defensine, $\beta$ -Defensine, $\theta$ -Defenine
vier S-S-Brücken	Drosomycin, Hepcidin, Defensin

Tab. 2 Strukturelle Klassen antibiotischer Peptide nach Zasloff, M. 2002



Sämtliche AP entstehen aus „Vor-Peptiden“, den so genannten Prepropeptiden, die posttranslational durch z.B. Glykosilierung, Isomerisierung oder Ringbildung (wie bei den  $\theta$ -Defensinen, die von Rhesus-negativen Affen isoliert wurden) modifiziert werden. Hierdurch entsteht innerhalb gruppengleicher AP eine enorme Vielfalt, so dass sich bei zwei unterschiedlichen Spezies einer Tiergattung kaum die gleiche Peptidsequenz wieder finden lässt (Zasloff 2002).

Der Nachweis über die Fähigkeit, AP zu produzieren, ist in einer Vielzahl von Geweben erfolgt, so z.B. in Derivaten des Knochenmarks (Granulozyten und Makrophagen), in spezialisierten Epithelzellen (Drüsen der Froschhaut, Vaginaepithel und die Paneth'schen Zellen des Dünndarms), im Flimmerepithel der Atemwege und in Keratinozyten. Speicherorte der AP sind intrazelluläre Granula in Granulozyten, Drüsen (wie beim Magainin) oder dem Verdauungstrakt (Gallo et al. 1998).

Den AP wird es durch die kationischen Eigenschaften ermöglicht, mit der negativ geladenen Bakterienmembran zu interagieren und somit deren Zerfall herbeizuführen. Die Außenseite der Bakterienmembran besteht zu großen Anteilen aus Lipiden und negativ geladenen Phospholipid-Gruppen. Im Gegensatz dazu besteht die Außenseite der Zellen von Pflanzen und Tieren mehrheitlich aus Phospholipiden ohne elektrisch geladene Anteile, während der Anteil von Lipiden mit negativen Gruppen vermehrt zum Inneren, dem Zytosplasma, gewandt ist und somit nicht auf die AP wirken kann. Dadurch kann die Spezifität der AP für Mikroorganismen erklärt werden (s. Abb. 2) (Matsuzaki 1999).

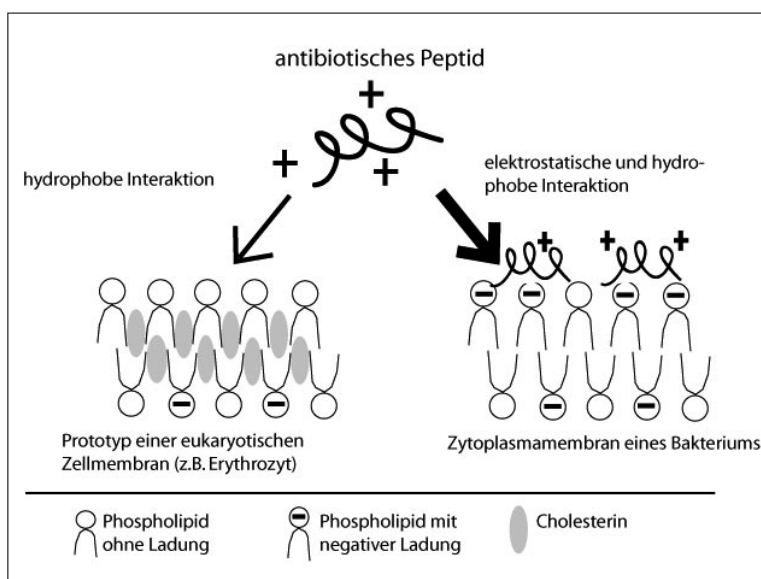


Abb. 2  
Spezifität antibiotischer Peptide  
nach Matsuzaki 1999

Die Tatsache, dass AP innerhalb der Zellen des Wirtsorganismus diese selbst nicht attackieren, erklärt sich auch daraus, dass in der Pro-Peptidform ein anionisches Pro-Segment den kationischen Anteil des Peptids neutralisiert (Gallo et al. 1998).

Ein Modell, das die Funktionsweise der meisten AP erklärt, ist das Shai-Matsuzaki-Huang-Modell (Matsuzaki 1999; Yang et al. 2000; Shai 1999). Das Modell (s. Abb. 3) beschreibt die Interaktion und Integration von AP mit der Außenmembran des Mikroorganismus (a). Dieser folgt eine Verdrängung von Lipiden, was zur Ausdünnung und Expansion der Außenmembran führt und ungleiche Ladungsverhältnisse zwischen Außen- und Innenmembran hervorruft (b). Es folgt die Phase der Porenbildung (c), wodurch AP auf die Innenseite der Zellmembran gelangen (d). Jetzt besteht für einige AP die Möglichkeit, den Untergang der Zelle herbeizuführen, indem sie Bestandteile des Zellinneren angreifen (f) oder - weit häufiger - indem sie den Zerfall der Zellmembran in Fragmente bewirken (e).

Zur Potenzierung ihrer Einzelwirkung zeigen AP teilweise „eine Synergie untereinander oder mit anderen Bestandteilen des angeborenen Immunsystems“ (Gallo et al. 1998). Zudem können sie als Schildwächter des erworbenen Immunsystems fungieren und dieses alarmieren, indem sie zelluläre Bestandteile wie z.B. Monozyten, T-Zellen und neutrophile Granulozyten anlocken (Zasloff 2002).

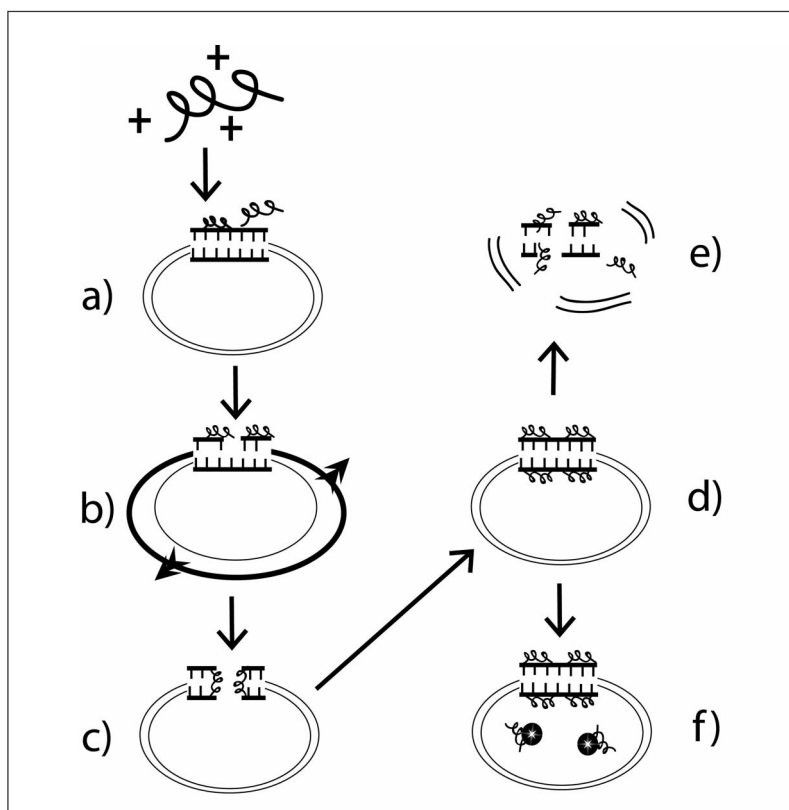


Abb. 3  
Das Shai-Matsuzaki-Huang-Modell, Erläuterungen s. Text

### **1.3.3      Ausgewählte antimikrobielle Peptide beim Menschen**

#### **1.3.3.1      Defensine**

Eine bedeutende Gruppe der AP ist die der Defensine, kleine kationische Peptide, die auf Chromosom 8p22-23 kodiert sind. Sie sind typischerweise cysteinreich. Dies hat die Bildung von drei oder vier intramolekularen Disulfidbrücken zur Folge. Es werden zwei Subklassen, die  $\alpha$ - und die  $\beta$ -Defensine, unterschieden, in die sich ein Großteil der Defensine rubrizieren lässt (Lehrer und Ganz 2002).

Die  $\alpha$ -Defensine bestehen aus 29-35 Aminosäuren und besitzen folgende Disulfidbrückenstruktur: Cys1-Cys6, Cys2-Cys4, Cys3-Cys5. Sie werden konstitutiv exprimiert und haben ein antimikrobielles Wirkspektrum gegen grampositive und gramnegative Bakterien sowie Pilze (Schröder 2002). Derzeit sind sechs  $\alpha$ -Defensine bekannt, die beim Menschen in Granulozyten (humanes neutrophiles Defensin (HNP) -1, -2 und -3), Alveolarmakrophagen und Paneth'schen Zellen des Dünndarms (humanes Defensin (HD) -5 und -6) nachgewiesen wurden (Raj et al. 2002).

Die  $\beta$ -Defensine bestehen aus bis zu 45 Aminosäuren, werden von Epithelzellen gebildet und unterscheiden sich von den  $\alpha$ -Defensinen in ihrer Disulfidbrückenstruktur: Cys1-Cys5, Cys2-Cys4, Cys3-Cys6 (Lehrer und Ganz 2002). Es werden vier  $\beta$ -Defensine unterschieden: Humanes  $\beta$ -Defensin (HBD) -1, -2, -3 und -4. Bis auf HBD-1, das auch konstitutiv im Gewebe exprimiert wird, sind alle induzierbar (Schröder 2002).

**1.3.3.1.1      HBD-1** ist in den Epithelzellen gesunder menschlicher Haut (Brust, Abdomen, Axilla, Perineum, Plantarfläche, behaartem Kopf und Gesicht), Schweiß- und Talgdrüsen, Pankreas und Niere (Ali et al. 2001), in Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen (Duits et al. 2002), sowie im Epithel der Atemwege und Brustdrüsen, Prostata und den Hoden (Zhao et al. 1996) nachweisbar. Die antimikrobielle Aktivität gegen grampositive Bakterien ist deutlich stärker als gegen gramnegative (Schröder 2002).

**1.3.3.1.2** Das Vorkommen von **HBD-2** wurde erstmalig in Keratinozyten von psoriatischen Hautläsionen beschrieben (Harder et al. 1997). Außerdem wurde es in Epithelzellen gesunder menschlicher Haut (Brust, Abdomen, Axilla, Perineum,

plantar, behaartem Kopf und Gesicht), Schweiß- und Talgdrüsen, Pankreas, Niere (Ali. et al. 2001) und den Epithelien der Atemwege (Duits et al. 2002) nachgewiesen. HBD-2 weist kaum Aktivität gegen grampositive, jedoch deutlich gegen gramnegative Bakterien und mäßige Aktivität gegen Pilze auf (Lehrer und Ganz 2002; Schröder 2002).

**HBD-1 und HBD-2** weisen eine lokalisationsabhängige Expression in normaler menschlicher Haut auf. Es zeigt sich eine deutlich stärkere (100%) Expression an offenen Körperstellen wie Gesicht, an behaartem Kopf und an Fußsohlen im Vergleich zu Brust und Abdomen (50%) (Ali et al. 2001).

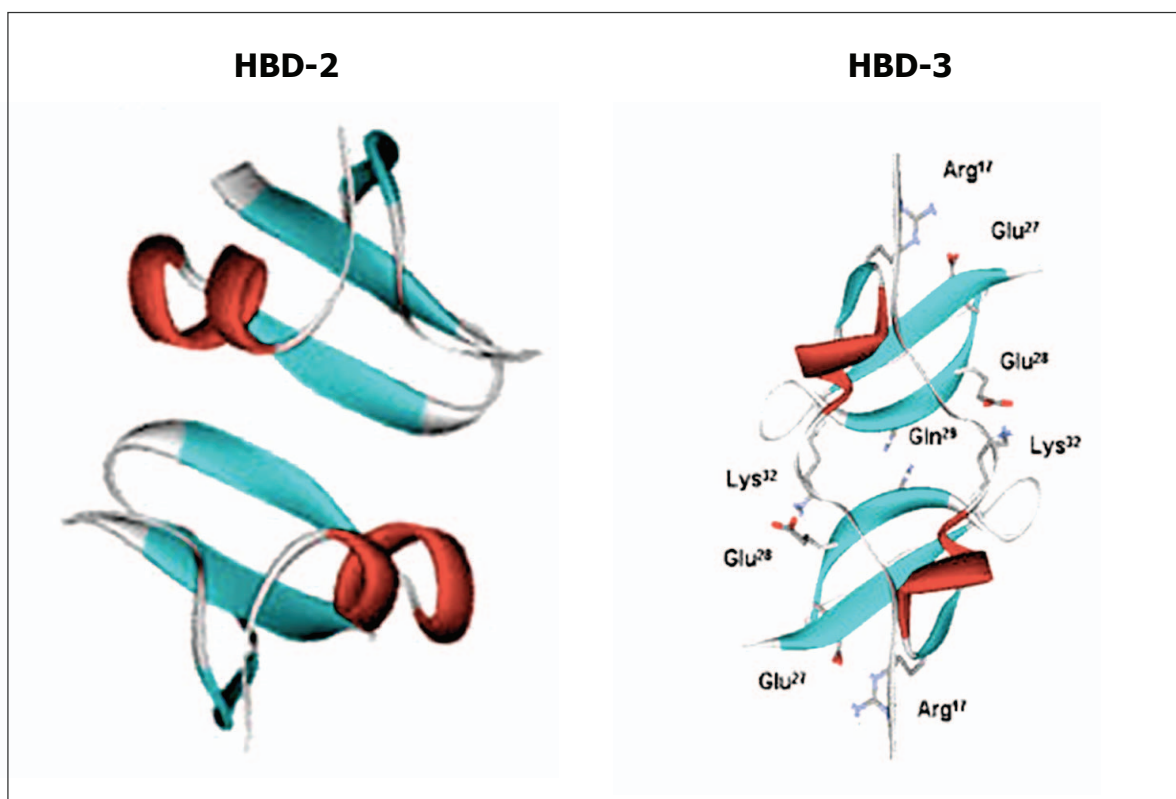


Abb. 4 Dreidimensionale Struktur von HBD-2 und -3, Antimicrobial Peptides Lab., Trieste, Italien.

**1.3.3.1.3 HBD-3**, erstmalig in Keratinozyten psoriatischer Läsionen belegt, weist seine stärkste Expression in der Haut und den Tonsillen auf. Es ist aber auch im Respirationstrakt, Uterus, Thymus, Zunge, Verdauungstrakt (Harder et al. 1997, 2001), Herz- und Skelettmuskel (Lehrer und Ganz 2002) nachweisbar. Das antimikrobielle Spektrum ist ausgeprägt gegen grampositive, -negative Bakterien und

Pilze, inklusive Problemkeime wie dem multiresistenten *Staphylokokkus aureus* und dem vancomycinresistenten *Enterococcus faecium* (Harder et al. 1997, 2001).

**1.3.3.1.4 HBD-4** kommt am stärksten in den Hoden und dem Antrum des Magens vor. Wesentlich schwächer ist die Expression in Uterus, neutrophilen Granulozyten und dem Respirationstrakt (Garcia et al. 2001). Es zeigt die bisher stärkste Aktivität der  $\beta$ -Defensine gegen *Pseudomonas aeruginosa* (Schneider et al. 2005).

**1.3.3.2 Psoriasin** (S 100A7) ist ein Mitglied der S100-Genfamilie, die auf Chromosom 1q21 lokalisiert ist. Sein Auftreten wurde erstmals 1991 von Madsen, P. et al. in psoriatischer Haut beschrieben. Es ist eine verstärkte Expression in Keratinozyten bei entzündlichen hyperproliferativen Hauterkrankungen (Algermissen et al. 1996), durch Einwirkung von UVB-Strahlung (Di Nuzzo et al. 2000), in Reaktion auf Calcium (Hoffmann et al. 1998), Retinoide (Tavakkol et al. 1994) und während anormaler Proliferation von Keratinozyten (Olsen et al. 1995) nachgewiesen worden. Außerdem wird es vermehrt beim Plattenepithelcarcinom der Harnblase (Ostergaard et al. 1999) und beim ductalen Carcinoma in situ der Mamma (Enerbäck et al. 2002) gebildet. Somit scheint es nicht nur bei der antimikrobiellen Abwehr, sondern auch bei Zellwachstum/-differenzierung und der Tumorgenese beteiligt zu sein.

Die Funktionsweise von Psoriasin scheint sich von dem der Defensine gänzlich zu unterscheiden: Für Psoriasin wurde eine bakterizide Wirksamkeit gegen *Escherichia coli* schon bei niedriger Dosierung nachgewiesen, die durch den Entzug verfügbarer Zink-Ionen (Gläser et al. 2002) vermittelt wird. In höherer Dosierung besitzt es jedoch auch antibakterielle Eigenschaften gegen *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylokokkus aureus* (Gläser et al. 2009).

#### **1.4 Warum zeigen Psoriatiker weniger bakterielle Superinfektionen der Haut als Neurodermitiker?**

Atopisches Ekzem (AD) und Psoriasis (PS) gehören zu den häufigsten chronisch entzündlichen Erkrankungen der Haut mit einer defekten Hautbarriere. Im Erwachsenenalter sind in Mitteleuropa von Psoriasis zwischen 1 und 3% und von AD zwischen 10 und 15% der Bevölkerung betroffen. Beide Krankheiten bedienen sich unterschiedlicher Mechanismen des adaptiven Immunsystems. Die AD ist vornehmlich durch eine TH2 - Zellen vermittelte Reaktion charakterisiert, was mit erhöhtem IgE und einer Aktivierung von eosinophilen Granulozyten einhergeht. Dagegen wird die Immunantwort von Psoriasis vornehmlich von TH1-Zellen vermittelt, die eine lokale Vermehrung von neutrophilen Granulozyten zur Folge hat (Braun-Falco et al. 2005). Auffällig ist, dass ca. 30% der ND-Patienten an häufigen und ernsthaften Hautinfektionen leiden und über 90% der ND-Patienten eine Besiedelung der Haut mit *Staphylokokkus aureus* aufweisen. Dagegen leiden nur 6,7% der PS-Patienten an Infektionen der Haut, wobei beiden Krankheitsbildern eine gestörte Barrierefunktion der Haut gemeinsam ist (Nomura et al. 2003). Hierbei hat die unterschiedliche zytokinvermittelte Expression von antimikrobiellen Peptiden eine Schlüsselfunktion.

HBD-2, HBD-3 und LL-37, sind bei AD wesentlich schwächer als bei PS nachweisbar. HBD-2 zeigte eine antimikrobielle Wirksamkeit gegen *S. aureus* in Kombination mit LL-37 (Ong et al. 2002; Nomura et al. 2003). Für HBD-3 ist eine hohe Wirksamkeit gegen *S. aureus* nachgewiesen (Harder et al. 2001, Kisich et al. 2007). Die Zytokine  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IFN-}\gamma$  und insbesondere die Kombination beider Zytokine bewirken eine verstärkte Expression von HBD-2 und HBD-3, während IL-4 und IL-13 die Expression beider AP unterdrücken (Nomura et al. 2003). Überträgt man diese Erkenntnisse auf die TH-1- bzw. TH-2-vermittelte Immunantwort von PS und AD, findet sich eine Erklärung für das diskrepante Auftreten von bakteriellen Superinfektionen bei beiden Krankheiten. Durch die TH-2-abhängige Immunantwort bei AD werden u. a. die Zytokine IL-4 und IL-13 freigesetzt. Diese bewirken eine Verminderung der  $\text{TNF-}\alpha$ - und  $\text{IFN-}\gamma$ -abhängigen Expression von HBD-2 und HBD-3. Somit manifestiert sich eine auf die Haut beschränkte Immundefizienz bei Patienten mit AD.

PSO hingegen, welches eine hohe antibakterielle Wirkung auf *E. coli* hat (Gläser et al. 2002), lässt sich in läsionaler Haut von AD-Patienten vermehrt nachweisen (Gläser et al. 2009). Hierfür scheint die defekte Barrierefunktion der Haut und nicht die TNF- $\alpha$  abhängige Stimulierbarkeit von PSO verantwortlich zu sein. Gläser et al. (2009) wiesen bei in-vivo-Untersuchungen eine Erhöhung von PSO nach zusätzlicher Schädigung der Hautbarriere in bestehenden Läsionen atopischer Patienten mittels Klebestreifen-Abriss nach.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Beteiligung von Zytokinen an der Expression der AP HBD-2, HBD-3 und Psoriasin bzw. der Fähigkeit zur Modulation in vivo herauszuarbeiten. Da es ethisch nicht vertretbar ist, solche Untersuchungen direkt am Menschen durchzuführen, wurde die Form des xenogenen Hauttransplantations-Modells gewählt. Das xenogene Hauttransplantationsmodell wurde hierfür erstmalig an der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Universität Leipzig etabliert. Die Untersuchungen fanden an humanen Hauttransplantaten auf NOD-SCID-Mäusen (NOD = Non obese diabetic, SCID = Severe combined immunodeficiency) statt.





## **2 AUFGABENSTELLUNG**

1. Ist das verwendete Modell, humane Haut auf NOD-SCID-Mäuse zu transplantieren, für anschließende in-vivo-Untersuchungen antibiotischer Peptide an menschlicher Haut geeignet?
2. Lassen sich antimikrobielle Peptide in der Spenderhaut vor der Transplantation nachweisen?
3. Lassen sich antimikrobielle Peptide in den Hauttransplantaten nachweisen?
4. Sind die Zytokine Tumor-Nekrose-Faktor-alpha ( $\text{TNF-}\alpha$ ), Interferon-gamma ( $\text{IFN-}\gamma$ ) und Interleukin-13 (IL-13) in der Lage, die Expression der antimikrobiellen Peptide zu modulieren?
5. Ergeben sich Unterschiede in der Expression auf RNA- bzw. Protein-Ebene?



### 3 MATERIAL UND METHODEN

Dieser Abschnitt der Arbeit gliedert sich in zwei wesentliche Teile: Kapitel 3.1 gibt eine umfassende Aufstellung über die verwendeten Materialien und deren Herkunft, Kapitel 3.2 beinhaltet eine detaillierte Beschreibung zur Umsetzung der angewandten Methoden.

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Versuchstiere

Es wurden FOX CHASE SCID/NOD Mäuse (SCID = Severe combined immuno-deficiency / NOD = Non obese diabetic) der Firma Taconic Europe verwendet, die im Medizinisch Experimentellen Zentrum der Universität Leipzig (MEZ LPZ) in dritter Generation gezüchtet wurden. Die Tiere wurden im MEZ LPZ unter sterilen Bedingungen gehalten. Futter, Wasser, Käfige und Streu wurden autoklaviert.

##### 3.1.2 Transplantation

- gesunde Vollhaut (Verschiebedreiecke) und Spalthaut vom Menschen aus plastischen Operationen an der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Universität Leipzig.

Spender	Alter (Jahre)	Geschlecht	Diagnose (histologisch)	Lokalisation	Anzahl Transplantate
1	41	w	SSM	fibular li.	2
2	76	w	Basaliom	Stirn li.	2
3	84	m	Mb. Bowen	hochparietal	4
4	91	m	Spinozelluläres Ca.	parietal re.	8
5	94	w	Plattenepithel-Ca.	Stirn li.	8
6	63	m	SSM	Oberschenkel re	4
7	61	w	LM Melanom	Wange li.	4
8	94	w	Keratoakanthom	Handrücken re.	2
9	65	m	Basaliom	Nasenspitze	4
10	94	w	Basaliom	retroauriculär re.	8

11	66	m	Compound-Naevus	Mamille re.	4
12	68	w	Basaliom	Nasenspitze	6
13	62	w	Basaliom	Rücken, oben medial	4
14	84	w	Basaliom	Schläfe li.	4
15	84	w	Plattenepithel-Ca.	Stirn li.	8
16	80	w	Plattenepithel-Ca.	Schläfe li.	2
17	62	w	kutaner LE	präaurikulär re.	2
<b>Spender</b>	<b>Alter (Jahre)</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Diagnose (histologisch)</b>	<b>Lokalisation</b>	<b>Anzahl Transplantate</b>

Tab 3. Übersicht der Spenderhaut bezogen auf Alter, Geschlecht, Vorerkrankung und Lokalisation.

- Medikamente für Kombinationsnarkose:

*Agonisten:*

Medetomidin	(Domitor®)	1.00 mg/ml
Midazolam	(Midazolam-ratiopharm®)	5.00 mg/ml
Fentanyl	(Fentanyl-Janssen®)	0.05 mg/ml

Die Agonisten (Medetomidin : Midazolam : Fentanyl) wurden im Verhältnis 0.5 : 1.0 : 1.0 angesetzt und vorsichtig gemischt. Davon wurden abhängig vom Körpergewicht der Maus folgende Mengen intraperitoneal verabreicht (Körpergewicht Maus – verabreichte Menge Narkosegemisch): 20 g – 0.05 ml, 25 g – 0.06 ml und 30 g – 0.07ml.

*Antagonisten:*

Antipamezol	(Antisedan®)	5.00 mg/ml
Flumazenil	(Anexate®)	0.10 mg/ml
Naloxon	(Naloxon-ratiopharm®)	0.40 mg/ml

Die Antagonisten (Antipamezol : Flumazenil : Naloxon) wurden im Verhältnis 0.5 : 5.0 : 3.0 angesetzt und vorsichtig gemischt. Davon wurden folgende Mengen subkutan verabreicht (Körpergewicht Maus – verabreichte Menge Narkosegemisch): 20 g – 0.17 ml, 25 g – 0.21 ml, 30 g – 0.25 ml

- Spritzen (1,0 und 0,5 ml) mit Kanülen

B. Braun, D-34212 Melsungen

- Desinfektionsspray Neo-Kodan®

Schülke & Mayr, D-22840 Norderstedt

- Octeniderm® - Spray farblos	Schülke & Mayr, D-22840 Norderstedt
- Kleintierschermaschine favorita II	Aesculap, D-78532 Tuttlingen
- Einmal-Feuchtrasierer Balea	dm-Drogeriemarkt
- Biopsiestanzen Biopsy Punch	Stiefel Laboratorium GmbH, D-63075 Offenbach am Main
- Einmal-Skalpelle (15er Klinge)	Aesculap, D-78532 Tuttlingen
- Steriles chirurgisches Besteck	Aesculap, D-78532 Tuttlingen
- Petrischalen	
- Nahtmaterial:	
resorbierbar          Vicryl 7/0	Johnson & Johnson, D-22851 Norderstedt
nicht resorbierbar    Ethilon 6/0	Johnson & Johnson, D-22851 Norderstedt
- Oleotüll	Aventis, D-65926 Frankfurt a. Main
- Pehahaft Binde 4 cm	Hartmann, D-89522 Heidenheim
- Fixomull®-Verbänden	Hartmann, D-89522 Heidenheim
- physiologische Kochsalzlösung 0.9%	B. Braun, D-34212 Melsungen
- Sterile ES-Kompressen	Hartmann, D-89522 Heidenheim

### 3.1.3 Modulation mit Zytokinen

Es wurden folgende Zytokine in unterschiedlichen Konzentrationen intracutan in die transplantierte menschliche Haut appliziert:

- rekombinanter humaner Tumornekrosefaktor alpha (rHu TNF- $\alpha$ ) der Firma Strathmann Biotec AG, D-22459 Hamburg
- rekombinantes humanes Interferon gamma (rHu IFN- $\gamma$ ) der Firma Strathmann Biotec AG, D-22459 Hamburg
- rekombinantes humanes Interleukin 13 (rHu IL-13) der Firma PromoCell, D-69126 Heidelberg

### 3.1.4 Probenaufarbeitung

*Paraffinproben:* - 4% Formaldehyd

O. Fischer GmbH & Co KG, D-66067 Saarbrücken

*Gefrierproben:* - 4% Paraformaldehyd

(in 100 mM DEPC [Diethylpyrocarbonat] PBS bei pH 7.4)

C. Roth GmbH & Co KG, D-76185 Karlsruhe

- 30% Sucrose (30g Sucrose in DEPC PBS 100mM gelöst)

C. Roth GmbH & Co KG, D-76185 Karlsruhe

### 3.1.5 Immunhistochemischer Nachweis (IHC)

*Primärantikörper:*

- Antikörper gegen Psoriasin (PSO), monoklonal, Maus

Biocarta GmbH, D-22453 Hamburg

- Antikörper gegen Humanes  $\beta$ -Defensin-2 (HBD-2), polyklonal, Ziege

Peptotech, Rocky Hill, NJ 08553, USA

- Antikörper gegen Humanes  $\beta$ -Defensin-3 (HBD-3), polyklonal, Kaninchen

MoBiTec GmbH, D-37083 Göttingen

- Antikörper gegen Humane Fibrozyten (AS 02), monoklonal

PD Dr. rer. nat. A. Saalbach, Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Universität Leipzig, D-04103 Leipzig

*Sekundärantikörper:*

- RTLL Multilink® AP/Fast Red für PSO, HBD-3 und AS 02

BioGenex, San Ramon, CA, USA

- Anti-Ziege-AP-AK für HBD-2

Biologo, D-24119 Kronshagen

### *Färbung:*

- DAKO Neufuchsin-Substratsystem Code-Nr. K 0698

DAKO Diagnostika GmbH, D-22004 Hamburg

- Hämatoxylin
- Eosin
- Kernechtrot

### *Waschpuffer:*

- Tris-Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (TBS) in 0.3% Tween

9 g	NaCl	
6.05 g	TRIS® (C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> )	Carl Roth GmbH & Co, D-76185 Karlsruhe
3 ml	Tween 20®	Carl Roth GmbH & Co, D-76185 Karlsruhe
ad 1000 ml	Aqua dest	pH 7.6

- Aquatex® Merck KG, D-64271 Darmstadt

## **3.1.6 In-situ-Hybridisierung (ISH)**

- Xylol
- 100%, 96%, 70% Ethanol

- Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS) in ddH<sub>2</sub>O

80.0 g	NaCl	
11.5 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	
2 g	KCl	
2 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
10 ml	Diethylpyrocarbonat (DEPC)	
ad 10 l	Aqua dest.	pH 7.3

- 20 x Natriumchlorid-Natriumcitrat-Stammlösung (SSC) in ddH<sub>2</sub>O

175.3 g	NaCl
88.2 g	Natriumcitrat

1 ml DEPC  
ad 1000 ml Aqua dest. pH 7.0

- Hybridisierungspuffer (Hyb)

200 ml 40% Formamid  
100 ml 10% Dextran-Sulfat  
5 ml 1x Denhardt's Lsg. (0.02% Ficoll, 0.02% Polyvinylpyrrolidone,  
0.2 mg/ml RNase-freies bovines Serumalbumin)  
100 ml 4x SSC  
95 ml DEPC-H<sub>2</sub>O

- Puffer - III

121.2 g TRIS® (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>) Carl Roth GmbH & Co, D-76185 Karlsruhe  
58.4 g NaCl  
ad 10 l Aqua dest. pH 9.5

- Entwicklungspuffer - III

50 ml Puffer - III  
1 g PolyVinylAlkohol (PVA)  
in der Mikrowelle kochen bis gelöst  
50 µl MgCl<sub>2</sub>

- TE-Puffer

5 ml 1M TRIS® (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>) Carl Roth GmbH & Co, D-76185 Karlsruhe  
78.8 g / 500 ml; pH 8.0  
1 ml 0.5 M Chelaplex III (Dinatriummethyldiamintetraacetat)  
18.61 g EDTA x Na<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O + 80 ml H<sub>2</sub>O + ca. 2 g festes NaOH  
ad 500 ml Aqua dest.

- Blockierungspuffer (1% BSA in PBS/TBS)

10.0 g bovines Serumalbumin (BSA)  
(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-82041 Deisenhofen)  
ad 1000 ml PBS / TBS



- Triethanolamin (TEA)-Essigsäureanhydrid-Puffer

0.1 M TEA in DEPC-H<sub>2</sub>O                      pH 8.0

0.25% (v/v) Essigsäureanhydrid

Cave: Hohe Instabilität von Essigsäureanhydrid

Zugabe unmittelbar vor Inkubation.

- Tri-Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (TBS)

9 g                      NaCl

6.05 g                      TRIS® (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>)      Carl Roth GmbH & Co, D-76185 Karlsruhe

ad 1000 ml      Aqua dest                      pH 7.6

- Glycin

- 4% (w/v) Paraformaldehyd (in 100 mM DEPC-PBS bei pH 7.4)

- Lachssperma DNA (Sheared Salmon Sperm DNA): 40 µg / 1 ml Hyb-1

Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH,

D-22331 Hamburg

Cave: Zugabe unmittelbar vor Prähybridisierung.

- Parafilm „M“ Laboratory Film                      American Can Company,

Greenwich, CT, 06830 USA

- Anti-DIG-AP AK [Fab-Fragmente]                      Boehringer, D-68167 Mannheim

- NBT -                      Promega Cooperation,

[Nitroblue-Tetrazolium]                      Madison, WI, 53711-5399 USA

- BCIP -                      Promega Cooperation,

[5-bromo-4-chlor-3-indolyl-phosphate] Madison, WI, 53711-5399 USA

- Kernecht-Rot

- Mountex®                      Medite GmbH, D-31303 Burgdorf

### 3.1.7 Mikroskopieren und Fotodokumentation

Olympus BX41TF-Mikroskop

Olympus, Japan

Olympus Digital Kamera C-5050

Olympus, Japan

### **3.1.8 Sonstiges Laborgerät und -bedarf**

Hybridofen Whatman/Biometra OV1	Biometra, D-37079 Göttingen
Gefriermikrotom Microm HM 560	Microm International GmbH, D-69190 Walldorf
Eppendorf Zentrifuge 5417	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, D-22331 Hamburg
Pipetten (0.1 - 2.5, 0.5 - 10.0, 10 - 100, 50 - 250, 100 - 1000µl)	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, D-22331 Hamburg
Handschuhe Peha-soft®	Hartmann, D-89522 Heidenheim
Nitril-Handschuhe N-DEX®	Best Glove Manuf. Ltd., Coaticook, QC, USA

## **3.2 Methoden**

Die Etablierung der in den Kapiteln 3.2.2 bis 3.2.4 beschriebenen Methoden (Transplantation menschlicher Haut auf NOD-SCID Mäuse, Modulation der Expression antibiotischer Peptide mit Zytokinen und Probenentnahme) sind wesentlicher Bestandteil der vorliegenden Arbeit und wurden an der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Universität Leipzig erstmalig durchgeführt.

### **3.2.1 Tierversuchsvorhaben**

Zur Durchführung des Tierversuches (TVV-Nr.11 / 02) lag zu jeder Zeit eine Genehmigung nach § 8 Abs. 1 des Tiergesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 25. 05. 1998 (GBl. I S. 1094 / GVBl. S. 1109) durch das Regierungspräsidium Leipzig vor.

### 3.2.2 Transplantation

In diesem Tierversuch wurde gesunde menschliche Haut auf NOD-SCID Mäuse transplantiert. Grundsätzlich wurden auf jede Maus mindestens zwei Transplantate aufgebracht. Je nach Größe der Maus konnten auch vier Hautstücke transplantiert werden.

Die zu transplantierende menschliche Haut wurde zwischen der Entnahme im OP der Hautklinik der Universität Leipzig und der Aufbringung auf die Maus in steriler PBS-Lösung bei 4 °C aufbewahrt. Die Transplantation erfolgte spätestens innerhalb 12 Stunden nach Entnahme im OP-Saal des Medizinisch-Experimentellen Zentrum (MEZ) der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig.

In Vorbereitung zur Transplantation wurde die Spenderhaut mit sterilem Skalpell und steriler Pinzette, möglichst ohne die Epidermis zu beschädigen, von subkutanem Fettgewebe und dem Großteil der Dermis getrennt. Um ein Austrocknen zu verhindern, wurde das Hautstück stetig mit PBS feucht gehalten.

Vor Transplantation wurde die Maus ihrem Gewicht entsprechend mit Domitor®, Midazolam-ratiopharm® und Fentanyl-Janssen® narkotisiert. Die Injektion der Agonisten wurde intraperitoneal im Bereich des rechten Unterbauches appliziert. Es erfolgte zunächst die Rasur der Empfängerstelle zwischen und hinter den Schulterblättern mit einem elektrischen Rasierapparat und handelsüblichen Einmal-Feucht-Rasierern. Danach wurde das Gebiet mit Octeniderm®-Spray desinfiziert. Mit einer Biopsiestanze von 0,8 cm Durchmesser und unter Zuhilfenahme von sterilem Skalpell und Schere wurde je ein kreisrundes Hautstück zu beiden Seiten der Wirbelsäule entnommen, ohne Beschädigung von Blutgefäße oder Nerven. Je eine Hälfte der entnommenen Maushaut wurde bis zur weiteren Verarbeitung als Gefrierprobe in 4% (w/v) Paraformaldehyd und als Paraffinprobe in Formalin bei 4°C gelagert. Nachfolgend wurden aus der vorbereiteten zu transplantierenden menschlichen Haut Stücke in Größe der gesetzten Läsionen präpariert. Dies erfolgte ebenfalls mit Biopsiestanze, Skalpell und Schere. Das Transplantat wurde auf die entsprechende Stelle am Mausrücken aufgelegt und mittels resorbierbarer Fäden mit 4-6 Einzelknopfnähten festgenäht. Die Wunde wurde mit Oleotüll®-Gaze und Fixomull®-Verbänden abgedeckt. Abschließend wurden die Transplantate mit einem

gürtelförmigen Verband um den gesamten Mauskörper aus Peha®-Haftbinden fixiert. Die Enden des Verbandes wurden mit nichtresorbierbaren Fäden innerhalb des Verbandes verankert.

Im Anschluß wurde die Narkose mit der gewichtsspezifischen Menge von Antisedan®, Anexate® und Naloxon-ratiopharm® aufgehoben. Die Applikation der Antagonisten erfolgte subkutan unter die Kopfhaut zwischen beiden Mäuseohren.

Von der restlichen gesunden menschlichen Spenderhaut, aus der die Transplantate gewonnen worden waren, wurde bis zur weiteren Verarbeitung je ein Präparat als Gefrierprobe in 4% (w/v) Paraformaldehyd und als Paraffinprobe in Formalin bei 4°C asserviert.

Es erfolgten regelmäßig Verbandkontrollen, der erste Verbandwechsel nach 7 Tagen. Nach ca. 3 Wochen konnte der Verband endgültig entfernt werden.

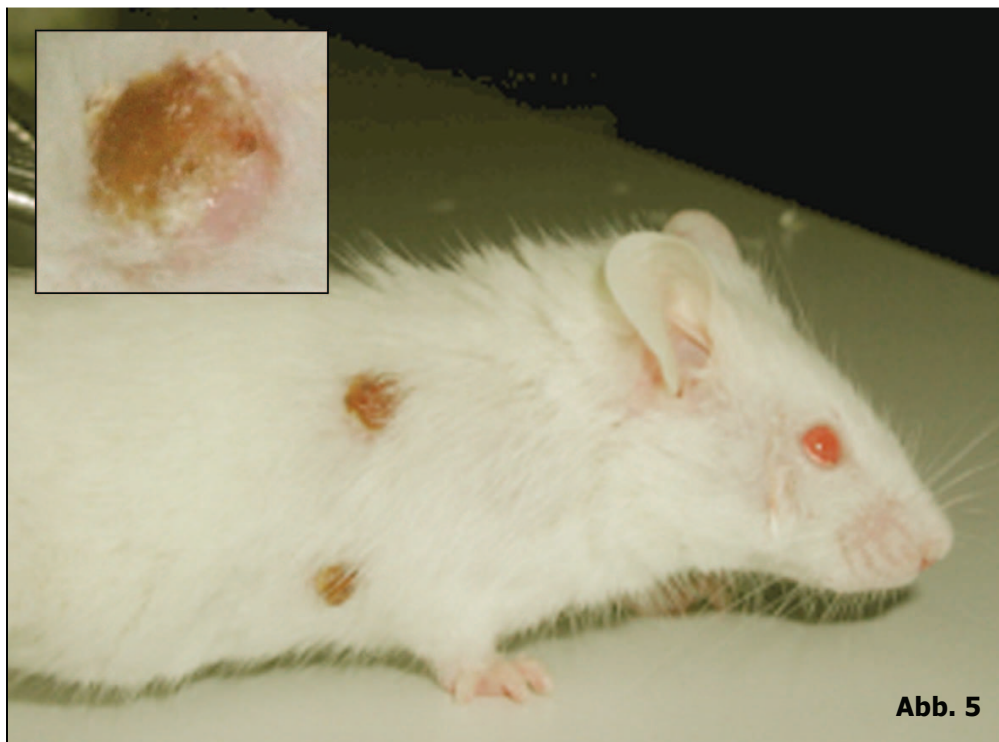


Abb. 5 Transplantate auf NOD-SCID Maus 14 Tage nach Transplantation

### **3.2.3 Modulation mit Zytokinen**

Um die Beeinflussung der Expression antibiotischer Peptide zu untersuchen, wurden die Zytokine Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ), Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) und Interleukin-13 (IL-13) in die Transplantate appliziert.

Der Zeitpunkt der Applikation lag 8 bis 10 Wochen nach dem Tag der Transplantation. Voraussetzung war, dass die transplantierte menschliche Haut in das umliegende Gewebe makroskopisch eingewachsen war und aus klinischer Sicht reizlos erschien.

Die Zytokine wurden in unterschiedlichen Konzentrationen appliziert (TNF- $\alpha$  50, 75, 100, 150 und 200 ng; IFN- $\gamma$  50, 100, 150 und 250 ng; IL-13 125 ng). Hierzu wurden diese mit steriler physiologischer NaCl-Lösung verdünnt und intrakutan in das Transplantat mittels 0,5 ml Insulinspritzen vorsichtig injiziert. Es wurde zu jedem Transplantat, in das Zytokine appliziert wurden, auf derselben Maus in ein weiteres Transplantat derselben Haut das gleiche Volumen physiologische NaCl-Lösung injiziert, um mögliche durch den Injektionsvorgang bedingte Effekte auf AP darstellen zu können.

Zur Durchführung der Injektion wurde das Tier narkotisiert wie in den Kapiteln 3.3. und 4.2. bereits beschrieben.

### **3.2.4 Probenentnahme**

24 Stunden nach der Applikation der Zytokine wurde die Maus mittels Diethylether narkotisiert und mittels Überstreckung der Wirbelsäule getötet. Unmittelbar danach wurden die Transplantate zusammen mit einem zirkulären ca. 6 mm breiten Saum Maushaut entnommen und zu je einer Hälfte als Gefrierprobe in 4% (w/v) Paraformaldehyd und als Paraffinprobe in Formalin bei 4°C asserviert.

### 3.2.5 Immunhistochemischer Nachweis (IHC)

Immunhistochemie (IHC) ist eine Methode, bei der Proteine im Gewebe mit Hilfe von Antikörpern sichtbar gemacht werden können.

Die Proben wurden unmittelbar nach der Entnahme mit 4% (w/v) Paraformaldehyd (PFA) in DEPC-behandeltem PBS für 4 Std. bei 4°C fixiert, in 30% (w/v) Succrose für weitere 24 Std. bei 4°C eingelegt und bei –80°C gelagert. Von den fixierten Gewebestücken wurden mit einem Gefrier-Mikrotom MICROM-HM 560 bei –20°C 6-7 µm dünne Schnitte angefertigt und auf Superfrost-Plus-Objektträger aufgebracht und über Nacht bei 40°C getrocknet. Danach wurden die Schnitte entweder unmittelbar verarbeitet oder bei –80°C zwischengelagert. Vor der Verarbeitung der zwischengelagerten Schnitte wurden diese aufgetaut und mindestens 2 Std. bei 40°C getrocknet.

Die Schnitte wurden jetzt für 10 min bei –40°C in eiskaltem Aceton fixiert. Alle folgenden Schritte erfolgten bei Zimmertemperatur. Nach kurzem Trocknen an der Luft wurde der Primärantikörper wie folgt aufgetragen: Anti-PSO 1:500, Anti-HBD-2 1:750, Anti-HBD-3 1:750 in TBS verdünnt, AS 02 unverdünnt als Hybridomüberstand. Die hier verwendeten Antikörperkonzentrationen hatten sich in Vorversuchen der Arbeitsgruppe als optimal erwiesen. Es folgte die Inkubation für 60 min in einer feuchten Kammer. Die Schnitte wurden 3 x 5 min mit TBS - 0.3% Tween gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen.

Zum Nachweis von *PSO*, *HBD-3* und *AS 02* wurde als Sekundärantikörper das MultiLink AP / Fast Red - System verwendet. Hierzu wurden die Schnitte zuerst 1 x 20 min mit dem Multilink AK (anti-Maus-Biotin) in feuchter Kammer inkubiert, 3 x 5 min mit TBS - 0.3% Tween gewaschen und dann 1 x 20 min mit Streptavidin-Label inkubiert. Das enzymmarkierte Streptavidin hat eine hohe Bindungsaffinität zu den Biotin-Resten auf dem Multilink-AK.

Zum Nachweis von *HBD-2* wurden die Schnitte 1 x 60 min mit dem Sekundärantikörper Anti-Ziege-AP-AK in der feuchten Kammer inkubiert.

Alle Schnitte (*Nachweis von PSO, HBD-2, HBD-3 und AS 02*) wurden nun 2 x 5 min in TBS - 0.3% Tween und 1 x 5 min in TBS gewaschen. Die Färbung erfolgte mit dem DAKO Neufuchsin-Substratsystem, das unmittelbar während des letzten

Waschschrilles nach den Angaben des Herstellers angesetzt wurde. Die Färbung erfolgte unter mikroskopischer Kontrolle. Nachdem die Färbung mit Aqua dest. abgestoppt worden war, wurden die Objektträger 1 x in Aqua dest. gespült und für 1 - 5 min in Hämatoxylin gefärbt. Jetzt wurden sie 1 x in Aqua dest. und 3 x unter fließendem Leitungswasser gespült und anschließend in Leitungswasser gebläut. Sobald sie in der Luft getrocknet waren, wurden die Objektträger mit Aquatex eingedeckt und mikroskopiert.

### 3.2.6 Herstellung von Plasmiden und RNA-Sonden

Es wurden RNA-Antisense-Sonden, Sense-negativ- und 18S-positiv-Kontrollen für Psoriasin, HBD-2 und HBD-3 hergestellt.

*Klonierte cDNA Sequenzen:*

**-Psoriasin:** Ein 206 bp umfassendes cDNA-Fragment von Psoriasin cDNA

forward primer: 5' -GGCATGATCGACATGTTTCA- 3'

reverse primer: 5' -CCCAGCAAGGACAGAACTC- 3'

**-HBD-2:** Ein 206 bp umfassendes cDNA-Fragment von HBD-2 cDNA

forward primer: 5' -GACTCAGCTCCTGGTGAAGC- 3'

reverse primer: 5' -GAGACCACAGGTGCCAATTT- 3'

**-HBD-3:** Ein 206 bp umfassendes cDNA-Fragment von HBD-3 cDNA

forward primer: 5' -AGCCTAGCAGCTATGAGGATC- 3'

reverse primer: 5' -CTTCGGCAGCATTTTCGGCCA- 3'

Die jeweiligen cDNA-Sequenzen von Psoriasin, HBD-2 und HBD-3 wurden in *E. coli* kloniert. Dies geschah unter Verwendung des TOPO®-TA-Cloning-Kits (Invitrogen). Anschließend wurden die vermehrten Plasmide mit dem Qiaprep®-plasmid-isolation-kit (Qiagen) isoliert und sequenziert, um deren Übereinstimmung zu überprüfen. Um Antisense- und Sense-negativ-Kontrollen zu erhalten, wurden die Plasmide jeweils mit BamHI und XhoI linearisiert, und mit der SP6- und T7-RNA-Polymerase unter

Verwendung von digoxigenin-markiertem Uridin-Triphosphat entsprechend den Herstelleranweisungen (Roche Diagnostics, 82372 Penzberg) umgeschrieben.

### **3.2.7 In-situ-Hybridisierung (ISH)**

Die in-situ-Hybridisierung (ISH) ist eine molekularbiologische Methode, um Nukleinsäuren, also RNA oder DNA, in Geweben oder einzelnen Zellen histologisch nachzuweisen.

Die Proben wurden unmittelbar nach der Entnahme mit 4% Formaldehyd fixiert und nach Standardprotokollen in Paraffin eingebettet (Histokinette). Danach wurden mit einem Gefriermikrotom MICROM<sup>®</sup>HM 560 bei -20°C 6-7 µm dünne Schnitte angefertigt und auf Superfrost<sup>®</sup>-Plus-Objektträger aufgebracht und über Nacht bei 40°C getrocknet.

Alle Reagenzien bis einschließlich zur Hybridisierung wurden mit destilliertem deionisierten Wasser zubereitet (ddH<sub>2</sub>O), das mit 0,1% Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt worden war, ebenso wurden alle benötigten Geräte und Werkzeuge zuvor autoklaviert bzw. mit DEPC vorbehandelt. Um eine Kontamination mit RNAsen zu vermeiden, wurden während der Arbeiten Handschuhe getragen und unterschiedliche Glasgefäße für die Schritte der Vor- und Nachhybridisierung verwendet. Alle Prozeduren wurden bei Zimmertemperatur durchgeführt, sofern keine anderen Angaben gemacht sind.

Die ISH wurde mit DIG-markierten cRNA Sonden durchgeführt, die in der Abteilung für Experimentelle Dermatologie der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Universität Leipzig nach einem modifizierten Protokoll von Roche Diagnostics GmbH, D-82372 Penzberg hergestellt wurden.

Zunächst wurden die Schnitte 3 x 10 min in frischem Xylol entparaffiniert. Danach erfolgte die Rehydrierung für 1 x 5 min in je 100%, 96% und 70% Ethanol. Die folgende Sequenz von Inkubationsschritten erfolgte zur weiteren Vorbehandlung: 2 x 5 min in DEPC-PBS, 1 x 10 min in DEPC-PBS-Glycin (200 ml DEPC-PBS + 1.5 g



Glycin), 1 x 10 min in 4% (w/v) PFA auf dem Objektträger, 2 x 10 min TEA-Essigsäureanhydrid-Puffer (leicht schwenken), 1 x 15 min 5 x DEPC-SSC.

Zur Prähybridisierung wurden die Schnitte im Hybridisierungspuffer (Hyb) unter Zugabe von 1 mg/ml Lachssperma für 60 min bei 50°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde der Puffer entfernt. Zur Hybridisierung wurden die DIG - markierten Sonden (PSO, HBD-2 und HBD-3) im Verhältnis 1 : 30 (12 µl Sonde + 360 µl Hyb) mit Hyb verdünnt und appliziert. Es erfolgte die Inkubation mit je einer Sense- (Negativkontrolle), Antisense- (positiv für gesuchte RNA des antibiotischen Peptids) und 18S Antisense-Sonde (Positivkontrolle für RNA-Integrität). Die Schnitte wurden mit Parafilm abgedeckt und die RNA für 10 min bei 70°C in einer feuchten Kammer denaturiert. Danach folgte die Hybridisierung bei 50°C für 16 Std. ebenfalls in einer feuchten Kammer. Die ungebundenen Sonden wurden in den folgenden Waschschritten entfernt: 1 x 30 min in 2 x SSC bei Raumtemperatur, 1 x 60 min in 2 x SSC bei 50°C, 1 x 5 min in 1 x TBS, 1 x 15 min in 1% BSA-TBS. Zum immunologischen Nachweis der DIG-markierten Sonden wurden die Proben mit Anti-DIG-AP Antikörperkonjugat (1 : 500 in 0,5% BSA / TBS) 2 Std. in einer feuchten Kammer inkubiert. Es folgten Waschschriffe 2 x 15 min in TBS und 1 x 5 min in Puffer III. Die Entwicklung mit Naphthol-Biphosphat (NBT) und Bicholyindolylphosphat (BCIP) in 2,5 ml Entwicklungspuffer III erfolgte in der feuchten Kammer im Dunkeln. Nach 3-5 Std. - unter Sichtkontrolle - wurde die Reaktion mit Tris-EDTA-Puffer (pH 8) gestoppt. Der unspezifisch gebundene Farbniederschlag wurde durch die Inkubation in absolutem Ethanol für 60 min minimiert. Nach einem Waschschriff mit Aqua dest. wurden die Zellkerne maximal 5 min mit Kernechtrot gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte dehydriert und nach kurzem Lufttrocknen in Mountex eingedeckt.

### **3.2.8 Fotografische Dokumentation und Auswertung**

Die Präparate wurden mit einem Olympus Mikroskop BX41TF und einer digitalen Olympus Kamera C5050 aufgenommen.

Die unten abgebildeten Aufnahmen (Abb. 6 und 7, S. 31) zeigen exemplarisch die spezifische Reaktion der in der in-situ-Hybridisierung verwendeten RNA-Sonden und

der in der immunhistochemischen Methode verwendeten Antikörper. Die antibiotischen Peptide Psoriasin, HBD-2 und -3 werden in der in-situ-Hybridisierung mittels blauer Farbe und in der immunhistochemischen Methode mittels roter Farbe dargestellt.

Die Auswertung erfolgte auflichtmikroskopisch mit dem Mikroskop Olympus BX41TF.

Vergleichbare Einzelergebnisse wurden zu Gruppen zusammengefasst und semiquantitativ und qualitativ betrachtet:

- Nachweis der antimikrobiellen Peptide Psoriasin, HBD-2, HBD-3 in der humanen Haut vor Transplantation.
- Nachweis der antimikrobiellen Peptide Psoriasin, HBD-2, HBD-3 im humanen Hauttransplantat nach Injektion von NaCl 0.9% als Negativkontrolle.
- Nachweis der antimikrobiellen Peptide Psoriasin, HBD-2, HBD-3 im humanen Hauttransplantat nach Injektion von Zytokinen (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-13).

In den histologischen Hautschnitten wurden folgende Hautschichten und -strukturen auf die Expression o. g. antibiotischer Peptide untersucht: Str. corneum, granulosum, spinosum, basale, entzündliche Infiltrate, Endothel, Schweißdrüsen und Haarfollikel.

Die Ergebnisse der einzelnen Präparate wurden in folgende Kategorien eingeteilt:

0 = negativ, keine Reaktion bzw. keine Anfärbung im Präparat vorhanden, bei den positiven Reaktionen wurden drei Stärken je Ausprägung der Anfärbung unterschieden: + = schwach positiv, ++ = mäßig positiv und +++ = stark positiv.

Sämtliche Proben wurden auf RNA-Ebene mittels in-situ-Hybridisierung und auf Protein-Ebene mittels immunhistochemischer Nachweismethoden untersucht.

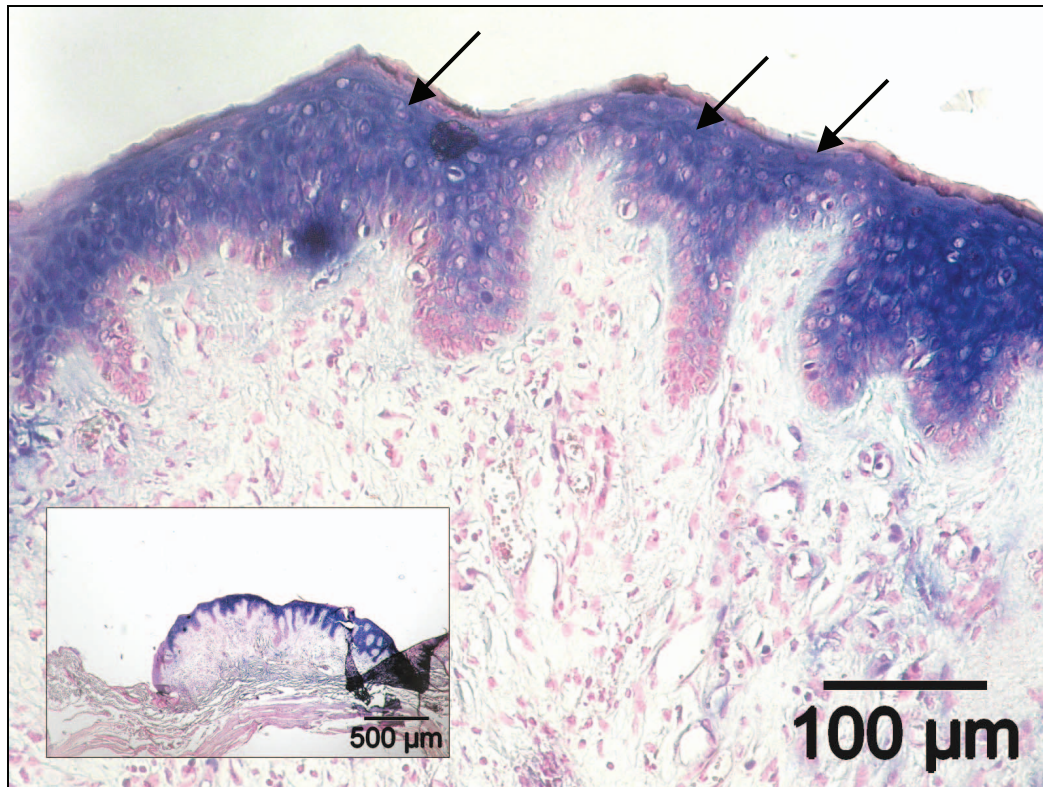


Abb. 6 Exemplarische Darstellung der spezifischen Reaktion (blau,  $\rightarrow$ ) der antibiotischen Peptide in der in-situ-Hybridisierung (ISH). Hier Nachweis von HBD-3 nach Injektion von IFN- $\gamma$  150ng.

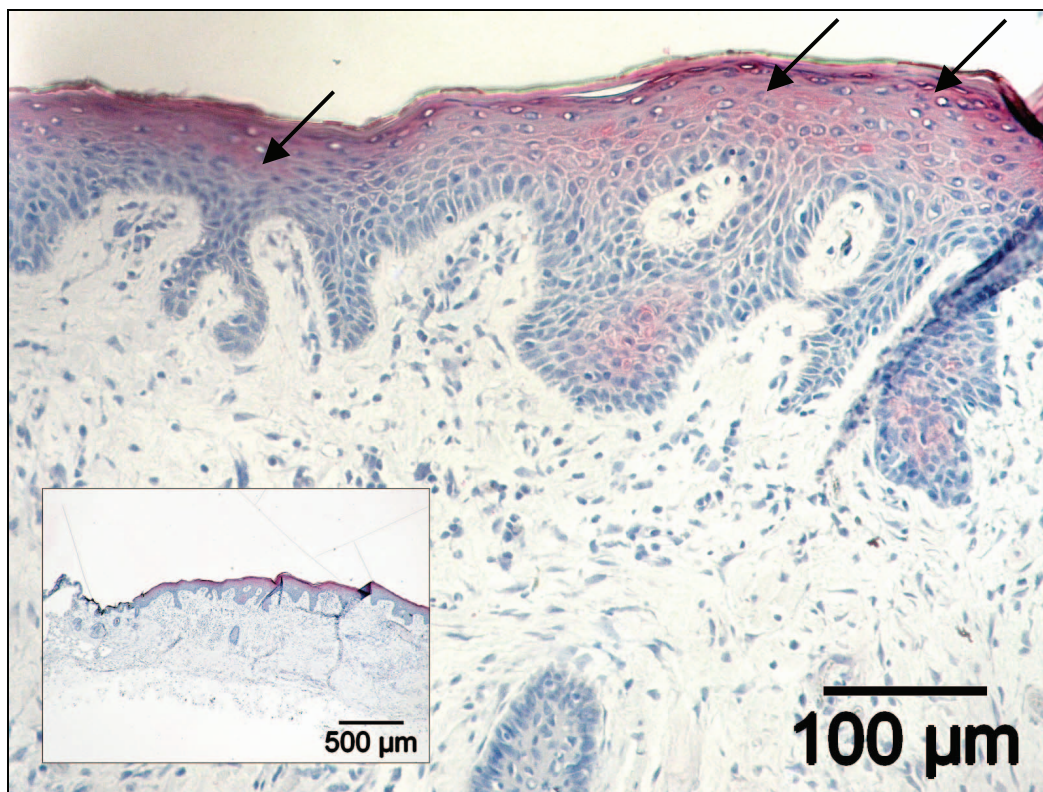


Abb. 7 Exemplarische Darstellung der spezifischen Reaktion (rot,  $\rightarrow$ ) der antibiotischen Peptide in der immunhistochemischen Methode (IHC). Hier Nachweis von PSO nach Injektion von TNF- $\alpha$  100ng.



## 4 ERGEBNISSE

Zunächst werden die im Transplantationsmodell erzielten Resultate dargestellt (Kap. 4.1). Dann folgt die Beschreibung des Nachweises antibiotischer Peptide vor (Kap. 4.2) und nach Transplantation (Kap. 4.3) sowie deren Modulation durch Zytokine (Kap. 4.5). In Kapitel 4.2 bis 4.5 werden die einzelnen Ergebnisse detailliert beschrieben und dann tabellarisch dargestellt. Am Ende eines jeden Kapitels folgt eine kurze Zusammenfassung. Abschließend werden die Resultate von in-situ-Hybridisierung und immunhistochemischer Methode qualitativ zusammengefasst und fotografisch dargestellt.

### 4.1 Das xenogene in vivo Maus-Transplantationsmodell

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 76 humane Hautproben auf NOD-SCID-Mäuse transplantiert. Davon wuchsen 64 Transplantate (T) reizfrei an, 12 wurden abgestoßen. Die Abstoßung erfolgte in den ersten zwei Wochen nach Transplantation. Dies entspricht einer erfolgreichen Transplantation in 84,2% der Fälle (s. Tab. 3, S. 17f und Abb. 8, S. 37).

Transplantate ohne Komplikation	64 Transplantate	84,2%
Transplantate mit Abstoßung	12 Transplantate	15,8%
Transplantate gesamt	76 Transplantate	100,0%

Tab. 4 Transplantate (T) und deren Heilungsverhalten in der Gesamtsumme

Die Anzahl der Versuchstiere betrug 28. Die Versuchstiere, die keines der Transplantate angenommen hatten, wurden einer zweiten Transplantation unterzogen. 5 der 28 Versuchstiere wurden zweimal transplantiert, hierdurch ergibt sich eine rechnerische Gesamtzahl von 33 Versuchstieren. 28 Mäuse wurden mit je 2 Transplantaten versorgt, davon 25 Versuchstiere im ersten und 3 Versuchstiere im zweiten Transplantationsdurchlauf. 5 Mäuse wurden mit je 4 Transplantaten versorgt, davon 3 Versuchstiere im ersten und 2 Versuchstiere im zweiten Transplantationsdurchlauf.



74 der transplantierten Hautproben waren kreisförmig und hatten einen Durchmesser von 0,8 cm. 2 waren rechteckig mit einer Kantenlänge von 1,5 x 1 cm. Die beiden rechteckigen Hautproben waren die zuletzt transplantierten. Da während der Aufarbeitung der kreisrunden Hautproben mittels ISH und IHC das gewonnene Material jeweils völlig aufgebraucht wurde, erfolgte damit der Versuch, ein Transplantat größerer Fläche auf das Versuchstier zu verbringen.

Die Verteilung abgestoßener Transplantate innerhalb einer Gruppe gleichartig transplanterter (bezogen auf Transplantatgröße und Anzahl pro Versuchstier) Hautproben stellt sich wie folgt dar (s. Tab. 5): Von den 12 abgestoßenen Transplantaten (15,8% aller transplantierten Hautproben) entfallen 11 (14,5% aller transplantierten Hautproben) auf die Gruppe der Versuchstiere, die mit je 2 kreisrunden Transplantaten mit einem Durchmesser von 0,8 cm versorgt wurden. Nur eines der abgestoßenen Transplantate (1,3% aller transplantierten Hautproben) wurde von den Versuchstieren abgestoßen, die mit 4 kreisrunden Transplantaten mit einem Durchmesser von 0,8 cm versorgt wurden. Beide rechteckigen Transplantate von 1,5 x 1 cm Größe wuchsen erfolgreich an.

<b>T -Größe u. -Anzahl / VT</b>	<b>n VT</b>	<b>abgestoßene T / gl-T, (%)</b>	<b>% / T (gesamt)</b>	<b>M</b>
D = 0,8 cm, 2 Stk., rund	27	11 / 54 (20,4%)	14,5%	1
D = 0,8 cm, 4 Stk., rund	5	1 / 20 (5%)	1,3%	2
1,5 x 1 cm, 2 Stk., rechteckig	1	0 / 2 (0%)	0%	3
	33		15,8%	

Tab. 5 Transplantate (T) und deren Abstoßung innerhalb gleichartig transplanterter Hautproben (gl-T). VT = Versuchstier, M = Transplantations-Methode

Bei den abgestoßenen Transplantaten handelte es sich um die Haut der Spender 3, 5, 10 und 13 (s. Tab. 3, S. 17f und Tab. 6). Bei Spender 3 wurde eines von 4 Transplantaten, bei Spender 5 wurden alle 8 Transplantate, bei Spender 10 wurden 2 von 8 Transplantaten und bei Spender 13 eines von 4 Transplantaten nicht angenommen.

3 der 28 Versuchstiere sind während der Arbeiten verstorben. Diese schieden somit von weiteren Untersuchungen aus. Der Sterbezeitpunkt lag 3 bis 5 Wochen nach erfolgreicher Transplantation, jedoch noch vor der geplanten Injektion von

Zytokinen. Zum Sterbezeitpunkt waren die Transplantate klinisch reizlos und frei von Infektionszeichen.

Spender	Alter (Jahre)	Geschlecht	Lokalisation	abgestoßene T / transplantierte T	%	M
5	94	w	Stirn	8 / 8	100	1
10	94	w	retroauriculär	2 / 8	25	1
3	84	m	hochparietal	1 / 4	25	1
13	62	w	oberer Rücken	1 / 4	25	2

Tab. 6 Nichterfolgreiche Transplantation in Bezug auf Alter und Geschlecht der Spender  
M = Transplantations-Methode

Alle erfolgreich transplantierten Hautproben unterlagen einer leichten Schrumpfung. Zum Zeitpunkt der Probenentnahme war eine Größenabnahme von bis zu 1,5 mm beim Durchmesser der kreisrunden 0,8 cm durchmessenden Transplantate (34,3% der Fläche) zu verzeichnen. Bei den beiden rechteckigen Transplantaten betrug die Schrumpfung 2 mm in der jeweiligen Kantenlänge (30,7% der Fläche).

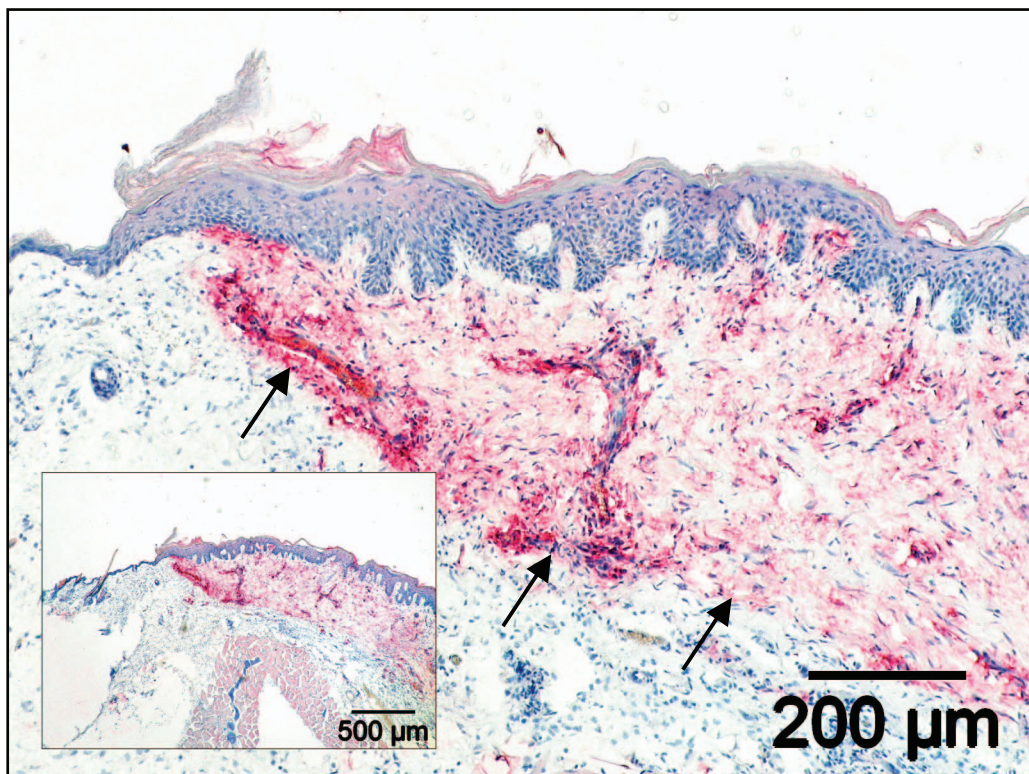


Abb. 8 Darstellung des Transplantates (rot, —>) durch Anfärbung von humanen Fibrozyten mit AS 02 in IHC. Deutliche Demarkierung vom umliegenden Maushaut-Gewebe, strukturell gut erhaltene humane Epidermis

## **4.2 Der Nachweis antibiotischer Peptide in der Spenderhaut vor Transplantation**

### **4.2.1 In-situ-Hybridisierung (ISH) (Tab. 7)**

Untersuchungen der Spenderhaut vor der Transplantation mittels ISH ergaben für die 3 AP Psoriasin (PSO), HBD-2 und HBD-3 folgendes Ergebnis:

- **PSO:** Es standen 25 unterschiedliche Hautproben zur Verfügung. Hiervon zeigte sich für PSO in 36% der Hautproben ein schwaches bis starkes Reaktionsmuster im Stratum (Str.) spinosum mit inkonstanter Ausprägung und teils fokalem Verteilungsmuster. Im Str. granulosum ist PSO in 36 % der Hautproben schwach bis mäßig vertreten. Die Reaktion ist ebenfalls inkonstant und teils fokal verteilt. In Str. corneum (20% der Hautproben) und basale (28%) lässt es sich schwach mit fokaler Verteilung nachweisen. Entzündliche Infiltrate sind in 4% der Hautproben mäßig angefärbt, Schweißdrüsen in 16% schwach und die Haarfollikel in 16% schwach bis mäßig mit inkonstanter Ausprägung. Im Endothel lässt sich keine Reaktion nachweisen.
- **HBD-2:** Es standen 25 unterschiedliche Hautproben zur Verfügung. Im Str. granulosum lässt sich HBD-2 in 4% der Hautproben mäßig bis stark bei inkonstanter Ausprägung nachweisen. In 8% der Hautproben ist HBD-2 im Str. spinosum schwach bis stark bei inkonstanter Ausprägung und fokal unterschiedlichem Verteilungsmuster vertreten. Ebenso in je 8% der Hautproben lässt sich HBD-2 in den Schweißdrüsen mäßig und in den Haarfollikeln schwach bis mäßig bei inkonstanter Ausprägung nachweisen. In Str. corneum und basale, Infiltrat und Endothel ist der Nachweis negativ.
- **HBD-3:** Hier standen 24 Hautproben zur Verfügung. Für HBD-3 reagierte das Str. spinosum in 25% der Hautproben mit einer schwachen bis starken Reaktion bei inkonstanter Ausprägung. Im Str. granulosum zeigte sich in 8% der Hautproben eine mäßige Reaktion. Bei 4% der Hautproben ließ es sich in den Schweißdrüsen schwach nachweisen. In Str. corneum und basale, Infiltrat, Endothel und Haarfollikeln war der Nachweis negativ.



Hautstrukturen	PSO	%	HBD-2	%	HBD-3	%
Str. corneum	f +	20	0	0	0	0
Str. granulosum	f (+ - ++)	36	(++ - ++++)	4	++	8
Str. spinosum	f (+ - ++++)	36	f (+ - ++++)	8	(+ - ++++)	25
Str. basale	f +	28	0	0	0	0
Infiltrat	++	4	0	0	0	0
Endothel	0	0	0	0	0	0
Schweißdrüsen	+	16	++	8	+	4
Haarfollikel	(+ - ++)	16	(+ - ++)	8	0	0
<b>Anzahl Hautproben:</b>	25		25		24	

Tab. 7 Nachweis AP in der Spenderhaut **vor** Transplantation (ISH);  
 +: schwach; ++: mäßig; +++: stark; ( ): inkonstant; 0: negativ; f: fokal

**Zusammenfassung:** Vor Transplantation war **PSO** in der **ISH** am häufigsten und stärksten in Str. granulosum und spinosum, weniger häufig und schwächer in Str. basale, corneum, Haarfollikeln, Schweißdrüsen und entzündlichem Infiltrat nachweisbar. **HBD-2** ließ sich am stärksten in Str. granulosum, spinosum und etwas weniger stark in Schweißdrüsen und Haarfollikeln nachweisen. **HBD-3** war am häufigsten und stärksten im Str. spinosum, sowie schwächer und seltener in Str. granulosum und Schweißdrüsen nachweisbar.

#### 4.2.2 Immunhistochemischer Nachweis (IHC) (Tab. 8)

In der IHC der Spenderhaut vor Transplantation ließen sich die 3 AP PSO, HBD-2 und HBD-3 wie folgt nachweisen:

- **PSO:** Es standen 24 Hautproben zur Verfügung. Im Str. corneum zeigte sich in 88% und im Str. granulosum in 58% der untersuchten Hautproben eine schwache bis mäßige inkonstant ausgeprägte Reaktion für PSO. In 42% der Hautproben ließ sich PSO im Str. spinosum schwach bis mäßig nachweisen. Die Ausprägung war inkonstant bei fokaler Verteilung. In den Schweißdrüsen ließ sich PSO in 13% der Hautproben schwach nachweisen. In den Haarfollikeln war der Nachweis bei 46% der Hautproben schwach bis mäßig inkonstant ausgeprägt. In Str. basale, Infiltrat und Endothel gelang kein Nachweis.
- **HBD-2:** Es wurden 24 Hautproben untersucht. Bei 8% der untersuchten Hautproben war HBD-2 mäßig in Str. corneum und granulosum nachzuweisen. Die

Haarfollikel zeigten in 17% der Hautproben eine schwache bis mäßige Reaktion bei inkonstanter Ausprägung. Die übrigen untersuchten Strukturen (Str. spinosum, basale, Infiltrat, Endothel und Schweißdrüsen) waren negativ.

- **HBD-3:** Es standen 23 Hautproben zur Verfügung. Bei 39% der Hautproben zeigte sich im Str. granulosum ein schwacher bis mäßiger Nachweis für HBD-3 bei inkonstanter Ausprägung und fokalem Verteilungsmuster. Ein schwacher Nachweis war bei 26% der Hautproben im Str. spinosum und bei 9% im Str. basale zu verzeichnen. In Str. corneum, Infiltrat, Endothel, Schweißdrüsen und Haarfollikeln war der Nachweis negativ.

Hautstrukturen	PSO	%	HBD-2	%	HBD-3	%
Str. corneum	(+ - ++)	88	++	8	0	0
Str. granulosum	(+ - ++)	58	++	8	f (+ - ++)	39
Str. spinosum	f (+ - ++)	42	0	0	+	26
Str. basale	0	0	0	0	+	9
Infiltrat	0	0	0	0	0	0
Endothel	0	0	0	0	0	0
Schweißdrüsen	+	13	0	0	0	0
Haarfollikel	(+ - ++)	46	(+ - ++)	17	0	0
<b>Anzahl Hautproben:</b>	24		24		23	

Tab. 8 Nachweis AP in der Spenderhaut **vor** Transplantation (IHC);  
 +: schwach; ++: mäßig; +++: stark; ( ): inkonstant; 0: negativ; f: fokal

**Zusammenfassung:** Vor Transplantation ließ sich **PSO** in der **IHC** in jedem zweiten Transplantat schwach bis mäßig in Str. granulosum, spinosum und den Haarfollikeln, noch häufiger im Str. corneum und schwächer in den Schweißdrüsen nachweisen. **HBD-2** war am häufigsten in den Haarfollikeln (schwach bis mäßig) und weniger häufig in Str. granulosum und corneum nachweisbar. **HBD-3** ließ sich am häufigsten und stärksten im Str. granulosum, schwächer in Str. spinosum und basale nachweisen.

### 4.3 Der Nachweis antibiotischer Peptide in der Spenderhaut nach Transplantation

Die Untersuchung der transplantierten Spenderhaut nach Injektion von NaCl 0,9% ohne Zytokine erfolgte mittels ISH (s. Kap. 4.3.1 und Tab. 9) und IHC (s. Kap. 4.3.2 und Tab. 10). Es wurde die Nachweisbarkeit der AP Psoriasin (PSO), HBD-2 und HBD-3 untersucht. Der Zeitpunkt der Probenentnahme lag 8 bis 10 Wochen nach Transplantation.

#### 4.3.1 In-situ-Hybridisierung (ISH) (Tab. 9)

- **PSO:** Es wurden 25 transplantierte Hautproben untersucht. Bei 40% der Hautproben ließ sich PSO im Str. spinosum und in 24% der Hautproben im Str. granulosum nachweisen. Das Vorkommen war jeweils inkonstant schwach bis mäßig. Im Str. corneum und basale ließ sich PSO in 8% der Hautproben schwach nachweisen. In Schweißdrüsen und Haarfollikeln war das Vorkommen in 4% der Hautproben schwach nachweisbar. Bei Infiltrat und Endothel war der Nachweis negativ.
- **HBD-2:** Es standen 25 Hautproben zur Verfügung. Im Stratum spinosum war das Vorkommen von HBD-2 in 20% der Hautproben bei inkonstanter Ausprägung schwach bis stark. Bei 12% der Hautproben ließ es sich in Str. basale und Haarfollikeln schwach bis mäßig bei inkonstanter Ausprägung nachweisen. Mäßig war

Hautstrukturen	PSO	%	HBD-2	%	HBD-3	%
Str. corneum	+	8	0	0	0	0
Str. granulosum	(+ - ++)	24	++	8	(+ - +++)	16
Str. spinosum	(+ - ++)	40	(+ - +++)	20	(+ - +++)	24
Str. basale	+	8	(+ - ++)	12	(+ - ++)	12
Infiltrat	0	0	0	0	0	0
Endothel	0	0	0	0	0	0
Schweißdrüsen	+	4	++	4	0	0
Haarfollikel	+	4	(+ - ++)	12	0	0
<b>Anzahl Hautproben:</b>	25		25		25	

Tab. 9 Nachweis AP im Transplantat nach Injektion von NaCl 0,9% **ohne Zytokin** (ISH);  
 +: schwach; ++: mäßig; +++: stark; ( ): inkonstant; 0: negativ; f: fokal

es im Str. granulosum bei 8% der Hautproben und in den Schweißdrüsen bei 4% nachweisbar. In Str. corneum, Infiltrat und Endothel war der Nachweis negativ.

- **HBD-3:** 25 Hautproben standen zur Verfügung. Im Str. spinosum war HBD-3 in 24% der Hautproben und im Str. granulosum bei 16% der Hautproben je inkonstant schwach bis stark nachweisbar. Im Stratum basale dagegen nur schwach bis mäßig bei 12% der Hautproben bei inkonstanter Ausprägung. Im Str. corneum, Infiltrat, Endothel, Schweißdrüsen und Haarfollikel war der Nachweis negativ.

**Zusammenfassung:** Nach der Transplantation war **PSO** in der **ISH** am häufigsten und stärksten (schwach bis mäßig) in Str. spinosum und granulosum, weniger häufig und schwächer in Str. basale, corneum, Schweißdrüsen und Haarfollikeln nachweisbar. **HBD-2** ließ sich schwach bis stark im Str. spinosum, schwächer und weniger häufig in Str. basale und Haarfollikeln und mäßig in Str. granulosum und Schweißdrüsen nachweisen. **HBD-3** war deutlich in Str. granulosum, spinosum und basale nachweisbar.

#### **4.3.2 Immunhistochemischer Nachweis (IHC) (Tab. 10)**

- **PSO:** Es wurden 23 Hautproben untersucht. Im Str. corneum ließ sich PSO in 69% der Hautproben und im Str. spinosum in 57% der Hautproben schwach bis mäßig nachweisen. Die Ausprägung war jeweils inkonstant und die Verteilung teils fokal. Im Str. granulosum war das Vorkommen von PSO in 65% der Hautproben ebenfalls inkonstant schwach bis mäßig. Die Haarfollikel wiesen in 4% der Hautproben ein schwaches Vorkommen von PSO auf. In Str. basale, Infiltrat, Endothel und Schweißdrüsen war PSO nicht nachzuweisen.

- **HBD-2:** 26 Hautproben standen zur Verfügung. HBD-2 konnte bei 12% der Hautproben im Str. corneum schwach bei fokaler Verteilung nachgewiesen werden. In Str. spinosum und Haarfollikeln war HBD-2 in je 8% der Hautproben schwach nachzuweisen. In den übrigen untersuchten Hautstrukturen (Str. granulosum, Str. basale, Infiltrat, Endothel und Schweißdrüsen) ließ sich kein HBD-2 finden.

- **HBD-3:** Es wurden 22 Hautproben untersucht. In 63% der Hautproben war HBD-3 im Str. granulosum und in 59% der Hautproben im Str. spinosum nachzuweisen; je

inkonstant schwach bis mäßig ausgeprägt. In Str. corneum, Str. basale, Infiltrat, Endothel, Schweißdrüsen und Haarfollikeln war es nicht nachzuweisen.

Hautstrukturen	PSO	%	HBD-2	%	HBD-3	%
Str. corneum	f (+ - ++)	69	f +	12	0	0
Str. granulosum	(+ - ++)	65	0	0	(+ - ++)	63
Str. spinosum	f (+ - ++)	57	+	8	(+ - ++)	59
Str. basale	0	0	0	0	0	0
Infiltrat	0	0	0	0	0	0
Endothel	0	0	0	0	0	0
Schweißdrüsen	0	0	0	0	0	0
Haarfollikel	+	4	+	8	0	0
<b>Anzahl Hautproben:</b>	23		26		22	

Tab. 10 Nachweis AP im Transplantat nach Injektion von NaCl 0,9% **ohne Zytokin** (IHC);  
+: schwach; ++: mäßig; +++: stark; ( ): inkonstant; 0: negativ; f: fokal

**Zusammenfassung:** Nach Transplantation war **PSO** in der **IHC** häufig schwach bis mäßig in Str. corneum, granulosum und spinosum und vereinzelt in Haarfollikeln nachweisbar. **HBD-2** ließ sich weniger häufig schwach in Str. corneum, spinosum und Haarfollikel nachweisen. **HBD-3** war gut in Str. granulosum und spinosum nachweisbar.

#### 4.4 Die Expression antibiotischer Peptide in der Spenderhaut vor und nach Transplantation im Vergleich

Bei einem Vergleich der nachgewiesenen Expression der antibiotischen Peptide PSO, HBD-2 und HBD-3 in der Spenderhaut vor Transplantation und nach Transplantation auf das Versuchstier mit Injektion von physiologischer Kochsalzlösung (NaCl) 0,9% als Negativkontrolle zeigt sich insgesamt ein sehr ähnliches Verteilungsmuster (vgl. Tab. 7, 8, 9 und 10).

Auf **RNA-Ebene (ISH)** fällt vor Transplantation für PSO und HBD-2 ein teils fokal unterschiedliches Verteilungsmuster, für PSO ein leicht vermehrter Nachweis in Str. spinosum, Schweißdrüsen und Haarfollikeln und für HBD-2 der insgesamt etwas weniger häufige, und im Str. basale fehlende Nachweis auf. HBD-3 ist vor

Transplantation etwas schwächer im Str. granulosum, nicht im Str. basale, jedoch vereinzelt in den Schweißdrüsen nachweisbar.

Auf **Protein-Ebene (IHC)** lässt sich vor Transplantation PSO in Schweißdrüsen und Haarfollikeln vermehrt, HBD-2 insgesamt etwas stärker als nach Transplantation, jedoch nicht im Str. spinosum nachweisen. HBD-3 ist vor Transplantation in Str. granulosum und spinosum etwas schwächer und weniger häufig als nach Transplantation, jedoch vereinzelt im Str. basale nachweisbar.

## **4.5 Die Modulation der Expression antimikrobieller Peptide durch Zytokine**

Im Folgenden wird die Expression der AP PSO, HBD-2 und HBD-3 im Transplantat nach Injektion von Zytokinen (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-13) dargestellt. Als Kontrolle diente ein Transplantat auf demselben Versuchstier, in das physiologische Kochsalzlösung (0.9% NaCl) appliziert wurde. Die Injektion erfolgte 8 bis 10 Wochen nach Transplantation. Die Hautproben wurden jeweils 24 Stunden nach der Injektion o.g. Substanzen entnommen. Die Untersuchungen erfolgten auf RNA-Ebene mittels in-situ-Hybridisierung und Protein-Ebene mittels immunhisto-chemischer Nachweismethode.

### **4.5.1 TNF- $\alpha$**

#### **4.5.1.1 In-situ-Hybridisierung (ISH) (Tab. 11-13)**

Nach Injektion von TNF- $\alpha$  (50, 75, 100, 150 und 200ng) war **PSO** in der ISH wie folgt exprimiert (s. Tab. 11 und Abb. 9, 12 und 13):

- Jeweils **50ng** wurden in 2 Transplantate appliziert. In sämtlichen untersuchten Hautstrukturen der TNF- $\alpha$ -injizierten Proben war kein PSO nachzuweisen. In der NaCl-Kontrolle war PSO einzig im Str. spinosum negativ bis schwach positiv mit fokaler Verteilung festzustellen.
- Jeweils **75ng** wurden in 3 Transplantate appliziert. PSO war darin im Str. spinosum nicht bis fokal stark und im Haarfollikel nicht bis fokal schwach nachweisbar. In der

NaCl-Kontrolle konnte PSO im Str. granulosum nicht bis mäßig, im Str. spinosum nicht bis mäßig bei fokaler Verteilung und im Str. basale nicht bis schwach ebenfalls bei fokaler Verteilung nachgewiesen werden. Alle übrigen untersuchten Hautstrukturen waren negativ.

- Jeweils **100ng** wurden in 3 Transplantate appliziert. PSO war darin im Str. spinosum schwach bis stark, im Str. granulosum und Haarfollikel nicht bis mäßig und im Str. basale nicht bis schwach nachweisbar. Die NaCl-Kontrolle erbrachte in Str. corneum, granulosum, spinosum und Haarfollikeln einen negativen bis schwach positiven Nachweis. Die übrigen untersuchten Hautstrukturen waren negativ.

PSO – ISH	TNF- $\alpha$	50ng	75ng	100ng	150ng	200ng
	Haut- strukturen	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl
	Str. corneum	0	0	0	0	0
		0	0	0 - +	0 - +	0
	Str. granulosum	0	0	0 - ++	+	0
		0	0 - ++	0 - +	0 - +	0
	Str. spinosum	0	0 - f+++	+ - +++	+ - f++	++
		0 - f+	0 - f++	0 - +	0 - +	0
	Str. basale	0	0	0 - +	0	+
		0	0 - f+	0	0	0
	Infiltrat	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0
	Endothel	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0
	Schweißdrüsen	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0
	Haarfollikel	0	0 - f+	0 - ++	0	0
		0	0	0 - +	0	0
	<b>N Hautproben:</b>	2	3	3	2 *	2 **
	Anmerkungen:	* u. **: Keine Epidermis in einem TNF- $\alpha$ -Transplantat				

Tab. 11 Nachweis von **PSO** im Transplantat **nach Injektion von TNF- $\alpha$**  (ISH);

+: schwach; ++: mäßig; +++: stark; f: fokal; 0: negativ

- Jeweils **150ng** wurden in 2 Transplantate appliziert. In diesen war PSO im Str. granulosum schwach und im Str. spinosum schwach bis mäßig mit fokalem Verteilungsmuster nachweisbar. In einem der beiden TNF- $\alpha$ -Transplantate war keine menschliche Epidermis in den untersuchten Proben nachzuweisen. Die NaCl-Kontrolle

war für PSO in Str. corneum, granulosum und spinosum negativ bis schwach positiv. Die übrigen untersuchten Hautstrukturen waren negativ.

- Jeweils **200ng** wurden in 2 Transplantate appliziert. Darin war PSO im Str. spinosum mäßig und im Str. basale schwach nachweisbar. Die übrigen Hautstrukturen des TNF- $\alpha$ -injizierten Transplantates und der NaCl-Kontrolle waren negativ. In einem der beiden TNF- $\alpha$ -Transplantate war keine menschliche Epidermis in den untersuchten Proben vorhanden.

**Zusammenfassung:** In der **ISH** ist eine deutlich verstärkte Expression von **PSO** im Str. spinosum nach Injektion von 75, 100 und 150ng TNF- $\alpha$ , bei 100ng TNF- $\alpha$  zusätzlich in Str. granulosum, basale und den Haarfollikeln nachweisbar.

**HBD-2** ließ sich nach Injektion von TNF- $\alpha$  (50, 75, 100, 150 und 200ng) in der ISH wie folgt nachweisen (s. Tab. 12, Abb. 10, 14 und 15):

- Jeweils **50ng** wurden in 2 Transplantate appliziert. In sämtlichen untersuchten Hautstrukturen der TNF- $\alpha$  Transplantate und der NaCl-Kontrolle war kein HBD-2 zu entdecken.

- Jeweils **75ng** wurden in 3 Transplantate appliziert. HBD-2 war darin im Str. spinosum nicht bis stark, in Str. basale, Schweißdrüsen und Haarfollikel nicht bis mäßig und in Str. granulosum und Endothel nicht bis schwach nachweisbar. HBD-2 ließ sich in der NaCl-Kontrolle in Str. granulosum und spinosum nicht bis mäßig nachweisen. Die übrigen untersuchten Hautstrukturen waren negativ.

- Jeweils **100ng** wurden in 3 Transplantate appliziert. In diesen war HBD-2 im Str. spinosum mäßig bis stark, in Str. granulosum und basale schwach bis mäßig und in Endothel sowie in Haarfollikeln nicht bis mäßig vertreten. In der NaCl-Kontrolle ließ sich HBD-2 in Str. spinosum, basale und Haarfollikel nicht bis mäßig nachweisen. Die übrigen untersuchten Hautstrukturen waren negativ.

- Jeweils **150ng** und **200ng** wurden in 2 Transplantate appliziert. In diesen und den dazugehörigen NaCl-Kontrollen war kein HBD-2 nachzuweisen. Bei einem der beiden mit 200ng TNF- $\alpha$  modulierten Transplantate war keine menschliche Epidermis nachweisbar.



HBD-2 – ISH	TNF- $\alpha$	50ng	75ng	100ng	150ng	200ng
	Haut- strukturen	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl
	Str. corneum	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0
	Str. granulosum	0	0 - +	+ - ++	0	0
		0	0 - ++	0	0	0
	Str. spinosum	0	0 - +++	++ - +++	0	0
		0	0 - ++	0 - ++	0	0
	Str. basale	0	0 - ++	+ - ++	0	0
		0	0	0 - ++	0	0
	Infiltrat	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0
	Endothel	0	0 - +	0 - ++	0	0
		0	0	0	0	0
	Schweißdrüsen	0	0 - ++	0	0	0
		0	0	0	0	0
	Haarfollikel	0	0 - ++	0 - ++	0	0
		0	0	0 - ++	0	0
	<b>N Hautproben:</b>	2	3	3	2	2 *
	Anmerkungen:	* : Keine Epidermis in einem TNF- $\alpha$ -Transplantat				

Tab. 12 Nachweis von **HBD-2** im Transplantat **nach Injektion von TNF- $\alpha$**  (ISH);  
+ : schwach; ++ : mäßig; +++ : stark; f : fokal; 0 : negativ

**Zusammenfassung:** Nach Injektion von TNF- $\alpha$  lässt sich in der **ISH** eine vermehrte Expression von **HBD-2** bei 75ng in Str. spinosum, basale und Schweißdrüsen und Haarfollikeln sowie bei 100ng in Str. spinosum, granulosum und Endothel feststellen.

Nach Injektion von TNF- $\alpha$  (50, 75, 100, 150 und 200ng) war **HBD-3** in der ISH wie folgt nachzuweisen (s. Tab. 13, Abb. 11, 16 und 17):

- Jeweils **50ng** wurden in 2 Transplantate appliziert. In sämtlichen untersuchten Hautstrukturen der TNF- $\alpha$ -Transplantate und der NaCl-Kontrolle war kein HBD-3 nachzuweisen.

- Jeweils **75ng** wurden in 3 Transplantate appliziert. In diesen war HBD-3 im Str. spinosum nicht bis stark und im Str. granulosum, basale, Schweißdrüsen und Haarfollikel nicht bis mäßig nachweisbar. In der NaCl-Kontrolle war einzig das Str. spinosum negativ bis schwach positiv. In den übrigen Hautstrukturen war HBD-3 nicht nachzuweisen.
- Jeweils **100ng** wurden in 3 Transplantate appliziert. HBD-3 ließ sich darin im Str. spinosum nicht bis stark, im Str. granulosum und Haarfollikel nicht bis mäßig und im Str. basale und Schweißdrüsen nicht bis schwach nachweisen. Alle übrigen untersuchten Hautstrukturen und die NaCl-Kontrolle waren negativ.
- Jeweils **150ng** wurden in 2 Transplantate appliziert. HBD-3 war darin im Str. granulosum mäßig und im Str. spinosum nicht bis stark, sowie im Str. basale nicht bis schwach nachweisbar. In den übrigen untersuchten Hautstrukturen der TNF- $\alpha$ - und NaCl-injizierten Präparate war HBD-3 nicht nachzuweisen.

HBD-3 – ISH	TNF- $\alpha$	50ng	75ng	100ng	150ng	200ng
	Haut- strukturen	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl
	Str. corneum	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0
	Str. granulosum	0	0 - ++	0 - ++	++	+
		0	0	0	0	0
	Str. spinosum	0	0 - +++	0 - +++	0 - +++	+++
		0	0 - +	0	0	+
	Str. basale	0	0 - ++	0 - +	0 - +	++
		0	0	0	0	0
	Infiltrat	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0
	Endothel	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0
	Schweißdrüsen	0	0 - ++	0 - +	0	0
		0	0	0	0	0
	Haarfollikel	0	0 - ++	0 - ++	0	++
		0	0	0	0	0
	<b>N Hautproben:</b>	2	3	3	2	2 *
	Anmerkungen:	* : Keine Epidermis in einem TNF-a-Transplantat				

Tab. 13 Nachweis von **HBD-3** im Transplantat **nach Injektion von TNF- $\alpha$**  (ISH);  
 +: schwach; ++: mäßig; +++: stark; f: fokal; 0: negativ

- Jeweils **200ng** wurden in 2 Transplantate appliziert. Darin war HBD-3 im Str. spinosum stark, in Str. basale und Haarfollikel mäßig und im Str. granulosum schwach nachweisbar. In einem der beiden TNF- $\alpha$ -injizierten Transplantate war keine menschliche Epidermis in den untersuchten Proben nachweisbar. Die NaCl-Kontrolle erbrachte im Str. spinosum einen schwachen Nachweis von HBD-3. Die übrigen untersuchten Hautstrukturen waren negativ.

**Zusammenfassung:** Die Expression von **HBD-3** ist in der **ISH** deutlich verstärkt ab einer Injektion von 75ng TNF- $\alpha$  in Str. granulosum, spinosum und basale, weniger ausgeprägt in Schweißdrüsen und Haarfollikeln nachweisbar.

#### **4.5.1.2 Immunhistochemischer Nachweis (IHC) (Tab. 14-16)**

Nach Injektion von TNF- $\alpha$  (50, 75, 100, 150 und 200ng) war **PSO** in der IHC wie folgt exprimiert (s. Tab. 14, Abb. 9, 24 und 25):

- Jeweils **50ng** wurden in 2 Transplantate appliziert. In diesen war PSO im Str. corneum schwach und im Str. granulosum mäßig positiv. Die NaCl-Kontrolle war für PSO in Str. corneum und spinosum mäßig und im Str. granulosum schwach positiv. Sämtliche übrigen untersuchten Hautstrukturen waren negativ. In je einem TNF- $\alpha$ - und NaCl-Präparat war keine menschliche Epidermis nachweisbar.

- Jeweils **75ng** wurden in 3 Transplantate appliziert. Für PSO war das Str. corneum mäßig positiv. In Str. granulosum und spinosum ließ sich PSO schwach bis stark nachweisen. Das Infiltrat war negativ bis schwach positiv. Der PSO-Nachweis in der NaCl-Kontrolle war im Str. corneum schwach bis mäßig, im Str. granulosum mäßig positiv, und im Str. spinosum negativ bis schwach positiv. Übrige untersuchte Hautstrukturen waren negativ.

- Jeweils **100ng** wurden in 3 Transplantate appliziert. Hier war PSO in Str. corneum und granulosum schwach bis mäßig positiv, im Str. spinosum schwach bis mäßig positiv mit fokaler Verteilung. In Str. basale und Endothel war PSO nicht bis schwach, in den Schweißdrüsen nicht bis mäßig und in den Haarfollikeln nicht bis stark nachweisbar. In Str. granulosum und spinosum der NaCl-Kontrolle war PSO schwach und im Str. corneum schwach bis mäßig positiv. In den übrigen untersuchten Hautstrukturen war PSO nicht nachweisbar.

- Jeweils **150ng** wurden in 2 Transplantate appliziert. In diesen war PSO in Str. corneum und granulosum schwach und im Str. spinosum mäßig positiv. Die NaCl-Kontrolle erbrachte einen ebenfalls schwachen Nachweis in Str. corneum und granulosum, sowie einen schwachen Nachweis mit fokaler Verteilung im Str. spinosum. Schweißdrüsen und Haarfollikel waren in keinem Schnitt nachzuweisen, übrige untersuchte Hautstrukturen unauffällig.
- Jeweils **200ng** wurden in 2 Transplantate appliziert. Aufgrund fehlender menschlicher Epidermis in den Proben beider Transplantate waren diese nicht beurteilbar. In Str. corneum und granulosum der NaCl-Kontrolle war PSO schwach positiv. Die übrigen untersuchten Hautstrukturen unauffällig.

PSO – IHC	TNF- $\alpha$	50ng	75ng	100ng	150ng	200ng
	Haut- strukturen	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl
	Str. corneum	+	++	+ - ++	+	nbb
		++	+ - ++	+ - ++	+	+
	Str. granulosum	++	+ - +++	+ - ++	+	nbb
		+	+	+	+	+
	Str. spinosum	0	+ - +++	+ - f++	++	nbb
		++	0 - +	+	f+	0
	Str. basale	0	0	0 - +	0	nbb
		0	0	0	0	0
	Infiltrat	0	0 - +	0	0	nbb
		0	0	0	0	0
	Endothel	0	0	0 - +	0	nbb
		0	0	0	0	0
	Schweißdrüsen	0	0	0 - ++	na	nbb
		0	0	0	na	na
	Haarfollikel	0	0	0 - +++	na	nbb
		0	0	0	na	na
	<b>N Hautproben:</b>	2 *	3	3	2	2 **
	Anmerkungen:	* : keine Epidermis in je einem TNF- $\alpha$ und NaCl-Transplantat ** : keine Epidermis in beiden TNF- $\alpha$ -Transplantaten				

Tab. 14 Nachweis von **PSO** im Transplantat **nach Injektion von TNF- $\alpha$**  (IHC);  
 +: schwach; ++: mäßig; +++: stark; f: fokal; 0: negativ; na: Struktur in Präparat nicht vorhanden;  
 nbb: nicht beurteilbar

**Zusammenfassung: PSO** ist in der **IHC** nach einer Injektion von TNF- $\alpha$  75ng und 100ng in Str. granulosum und spinosum deutlich verstärkt nachweisbar. Bei

100ng TNF- $\alpha$  zeigt sich zusätzlich ein verstärkter Nachweis in Haarfollikeln, Schweißdrüsen, Endothel und Str. basale.

**HBD-2** war nach Injektion von TNF- $\alpha$  (50, 75, 100, 150 und 200ng) in der IHC wie folgt exprimiert (s. Tab. 15, Abb. 10, 26 und 27):

- Jeweils **50ng** wurden in 2 Transplantate appliziert. Weder in diesen noch in der geführten NaCl-Kontrolle war HBD-2 nachweisbar.
- Jeweils **75ng** und **100ng** wurden in 3 Transplantate appliziert. In diesen war HBD-2 im Str. corneum negativ bis schwach positiv. Sämtliche übrigen untersuchten Hautstrukturen inklusive der NaCl-Kontrolle waren negativ.

HBD-2 – IHC	TNF- $\alpha$	50ng	75ng	100ng	150ng	200ng
	Haut- strukturen	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl
	Str. corneum	0	0 - +	0 - +	0 – f++	0 - f++
		0	0	0	0	f+
	Str. granulosum	0	0	0	0 – f+	0
		0	0	0	0	0
	Str. spinosum	0	0	0	0	+
		0	0	0	0	+
	Str. basale	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0
	Infiltrat	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0
	Endothel	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0
	Schweißdrüsen	0	0	0	na	na
		0	0	0	0	na
	Haarfollikel	0	0	0	na	0 - +
		0	0	0	0	0 - +
	<b>N Hautproben:</b>	2	3	3	2	2

Tab. 15 Nachweis von **HBD-2** im Transplantat **nach Injektion von TNF- $\alpha$**  (IHC);  
 +: schwach; ++: mäßig; +++: stark; f: fokal; 0: negativ; na: Struktur in Präparat nicht vorhanden

- Jeweils **150ng** wurden in 2 Transplantate appliziert. In diesen war HBD-2 im Str. corneum negativ bis fokal mäßig und im Str. granulosum negativ bis fokal schwach nachweisbar. Schweißdrüsen und Haarfollikel waren, da in den Proben nicht

vorhanden, nicht beurteilbar. Sämtliche untersuchten Strukturen der NaCl-Kontrolle waren negativ.

- Jeweils **200ng** wurden in 2 Transplantate appliziert. In diesen war HBD-2 im Str. spinosum schwach positiv. Im Str. corneum war HBD-2 nicht bis fokal mäßig und im Haarfollikel nicht bis schwach nachweisbar. Die NaCl-Kontrolle war für HBD-2 ebenso schwach positiv im Str. spinosum und negativ bis schwach positiv im Haarfollikel. Im Str. corneum war HBD-2 fokal schwach positiv nachweisbar. Die übrigen untersuchten Hautstrukturen waren negativ.

**Zusammenfassung:** Eine leichte Verstärkung der Expression von **HBD-2** in der **IHC** nach der Injektion von TNF- $\alpha$  lässt sich im Str. corneum ab einer Dosis von 75ng feststellen.

**HBD-3** war nach Injektion von TNF- $\alpha$  (50, 75, 100, 150 und 200ng) in der IHC wie folgt exprimiert (s. Tab. 16, Abb. 11, 28 und 29):

- Jeweils **50ng** wurden in 2 Transplantate appliziert. In den Proben eines Transplantates war keine menschliche Epidermis nachweisbar. In den Proben des zweiten Transplantates waren Haarfollikel und Schweißdrüsen nicht vorhanden. Die übrigen untersuchten Hautstrukturen waren negativ. In der NaCl-Kontrolle war HBD-3 lediglich im Str. granulosum negativ bis schwach positiv. Haarfollikel und Schweißdrüsen waren nicht vorhanden.

- Jeweils **75ng** wurden in 3 Transplantate appliziert. In diesen war HBD-3 im Str. granulosum schwach fokal bis mäßig positiv und im Str. spinosum negativ bis schwach positiv. Haarfollikel und Schweißdrüsen waren in den untersuchten Proben nicht vorhanden, übrige untersuchte Hautstrukturen waren negativ. In der NaCl-Kontrolle ließ sich HBD-3 einzig im Str. granulosum negativ bis mäßig nachweisen.

- Jeweils **100ng** wurden in 3 Transplantate appliziert. In diesen war HBD-3 im Str. granulosum schwach bis mäßig und im Str. spinosum nicht bis schwach nachweisbar. Schweißdrüsen waren nicht vorhanden. In der NaCl-Kontrolle war HBD-3 im Str. granulosum nicht bis schwach nachzuweisen. Haarfollikel waren nicht vorhanden. Übrige untersuchte Hautstrukturen waren negativ.

- Jeweils **150ng** wurden in 2 Transplantate appliziert. HBD-3 war in diesen und in der NaCl-Kontrolle im Str. granulosum schwach positiv. Schweißdrüsen und Haarfollikel waren in allen Proben nicht vorhanden. Die übrigen untersuchten Hautstrukturen waren unauffällig.

HBD-3 – IHC	TNF- $\alpha$	50ng	75ng	100ng	150ng	200ng
	Haut- strukturen	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl
	Str. corneum	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0
	Str. granulosum	0	f+ - ++	+ - ++	+	+ - ++
		0 - +	0 - ++	0 - +	+	0 - ++
	Str. spinosum	0	0 - +	0 - +	0	+
		0	0	0	0	0
	Str. basale	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0
	Infiltrat	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0
	Endothel	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0
	Schweißdrüsen	na	na	na	na	0 – na
		na	0	0 – na	na	na
	Haarfollikel	na	na	0 – na	na	na
		na	0	na	na	0 – na
	<b>N Hautproben:</b>	2 *	3	3	2	2
	Anmerkungen:	* : keine Epidermis in einem TNF- $\alpha$ -Transplantat				

Tab. 16 Nachweis von **HBD-3** im Transplantat **nach Injektion von TNF- $\alpha$**  (IHC);  
+: schwach; ++: mäßig; +++: stark; f: fokal; 0: negativ; na: Struktur in Präparat nicht vorhanden

- Jeweils **200ng** wurden in 2 Transplantate appliziert. In diesen war HBD-3 im Str. granulosum schwach bis mäßig und im Str. spinosum schwach positiv. Haarfollikel waren nicht nachweisbar. In der NaCl-Kontrolle war HBD-3 im Str. granulosum negativ bis mäßig positiv. Schweißdrüsen waren nicht vorhanden. Die übrigen untersuchten Hautstrukturen waren unauffällig.

**Zusammenfassung:** Die Expression von **HBD-3** in der IHC ist nach Injektion von TNF- $\alpha$  75, 100 und 200ng im Str. spinosum, bei TNF- $\alpha$  100ng zusätzlich im Str. granulosum verstärkt nachzuweisen.

## 4.5.2 IFN- $\gamma$

### 4.5.2.1 In-situ-Hybridisierung (ISH) (Tab. 17-19)

PSO – ISH	IFN- $\gamma$	50ng	100ng	150ng	250ng
	Haut- strukturen	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl
	Str. corneum	0	0	0	0
		0	0	0	nbb
	Str. granulosum	0	+ - ++	0 - +++	0
		0	+	0	nbb
	Str. spinosum	+	++	0 - +++	0
		0	0	0	nbb
	Str. basale	0	+	0	0
		0	0	0	nbb
	Infiltrat	0	0	0	0
		0	0	0	nbb
	Endothel	0	0	0	0
		0	0	0	nbb
	Schweißdrüsen	0	0 - na	na	0
		0	0	0	nbb
	Haarfollikel	0	0 - na	na	0
		0	0	0	nbb
	<b>N Hautproben:</b>	2	2	3	1 *
	Anmerkungen:	* : keine Epidermis im NaCl –Transplantat			

Tab. 17 Nachweis von **PSO** im Transplantat **nach Injektion von IFN- $\gamma$**  (ISH);  
+: schwach; ++: mäßig; +++: stark; f: fokal; 0: negativ; na: Struktur in Präparat  
nicht vorhanden; nbb: nicht beurteilbar

Nach Injektion von IFN- $\gamma$  (50, 100, 150 und 250ng) war **PSO** in der ISH wie folgt exprimiert (s. Tab. 17, Abb. 9, 18 und 19):

- Jeweils **50ng** wurden in 2 Transplantate appliziert. In diesen war PSO im Str. spinosum schwach positiv. Alle übrigen untersuchten Hautstrukturen inklusive der NaCl-Kontrolle waren negativ.
- Jeweils **100ng** wurden in 2 Transplantate appliziert. PSO war hierin im Str. granulosum schwach bis mäßig, im Str. spinosum mäßig und im Str. basale schwach positiv. Alle übrigen untersuchten Hautstrukturen inklusive der NaCl-Kontrolle waren negativ.



- Jeweils **150ng** wurden in 3 Transplantate appliziert. Hier war PSO in Str. granulosum und spinosum negativ bis stark positiv. In den IFN- $\gamma$ -injizierten Proben waren weder Schweißdrüsen noch Haarfollikel nachzuweisen. Alle übrigen untersuchten Hautstrukturen inklusive der NaCl-Kontrolle waren negativ.
- **250ng** wurden in ein Transplantat appliziert. In diesem war kein PSO nachweisbar. Die Proben der NaCl-Kontrolle wiesen keine menschliche Epidermis auf; somit war eine Expression von PSO nicht beurteilbar.

**Zusammenfassung: PSO** ist nach einer Injektion von IFN- $\gamma$  100 und 150ng in der **ISH** in Str. granulosum und spinosum deutlich stärker exprimiert.

**HBD-2** war in der ISH nach Injektion von IFN- $\gamma$  (50, 100, 150 und 250ng) wie folgt exprimiert (s. Tab. 18, Abb. 10, 20 und 21):

- Jeweils **50ng** wurden in 2 Transplantate appliziert. HBD-2 war in diesen und der dazugehörenden NaCl-Kontrolle in allen untersuchten Hautstrukturen nicht nachweisbar.
- Jeweils **100ng** wurden in 2 Transplantate appliziert. Hierin war HBD-2 in Str. granulosum und basale nicht bis schwach und im Str. spinosum nicht bis mäßig nachweisbar. Die übrigen untersuchten Hautstrukturen und die NaCl-Kontrolle erbrachten keinen Nachweis für HBD-2.
- Jeweils **150ng** wurden in 3 Transplantate appliziert. In diesen war HBD-2 im Str. granulosum nicht bis mäßig und im Str. spinosum nicht bis schwach vorhanden. Die dazugehörige NaCl-Kontrolle und übrigen Hautstrukturen waren negativ.
- **250ng** wurden in ein Transplantat appliziert. Der Nachweis für HBD-2 war in diesem negativ. In den Proben der NaCl-Kontrolle war keine menschliche Epidermis nachweisbar, somit konnte über eine Expression von HBD-2 keine Aussage getroffen werden.

HBD-2 – ISH	IFN- $\gamma$	50ng	100ng	150ng	250ng
	Haut- strukturen	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl
	Str. corneum	0	0	0	0
		0	0	0	nbb
	Str. granulosum	0	0 - +	0 - ++	0
		0	0	0	nbb
	Str. spinosum	0	0 - ++	0 - +	0
		0	0	0	nbb
	Str. basale	0	0 - +	0	0
		0	0	0	nbb
	Infiltrat	0	0	0	0
		0	0	0	nbb
	Endothel	0	0	0	0
		0	0	0	nbb
	Schweißdrüsen	0	0 – na	0 – na	0
		0	0	0	nbb
	Haarfollikel	0	0 – na	0 – na	0
		0	0	0	nbb
	<b>N Hautproben:</b>	2	2	3	1 *
	Anmerkungen:	* : keine Epidermis im NaCl-Transplantat			

Tab. 18 Nachweis von **HBD-2** im Transplantat **nach Injektion von IFN- $\gamma$**  (ISH);  
 +: schwach; ++: mäßig; +++: stark; f: fokal; 0: negativ; na: Struktur in Präparat  
 nicht vorhanden; nbb: nicht beurteilbar

**Zusammenfassung:** In der **ISH** ist **HBD-2** nach Injektion von IFN- $\gamma$  100 und 150ng verstärkt in Str. granulosum, spinosum und bei 100ng zusätzlich im Str. basale nachweisbar.

Nach Injektion mit IFN- $\gamma$  (50, 100, 150 und 250ng) war **HBD-3** in der ISH wie folgt exprimiert (s. Tab. 19, Abb. 11, 22 und 23):

- Jeweils **50ng** wurden in 2 Transplantate appliziert. HBD-3 war in diesen und der NaCl-Kontrolle nicht nachweisbar.
- Jeweils **100ng** wurden in 2 Transplantate appliziert. Darin war HBD-3 im Str. granulosum schwach und im Str. spinosum mäßig positiv. In der NaCl-Kontrolle war HBD-3 im Str. granulosum ebenfalls schwach und im Str. spinosum schwach bis mäßig bei fokaler Verteilung nachzuweisen. Die übrigen untersuchten Hautstrukturen waren negativ.

- Jeweils **150ng** wurden in 3 Transplantate appliziert. Hier war HBD-3 im Str. granulosum nicht bis stark positiv, im Str. spinosum mäßig bis stark positiv und im Str. basale schwach bis mäßig positiv nachzuweisen. In den Schweißdrüsen war es schwach und in den Haarfollikeln mäßig nachweisbar, wobei nicht alle untersuchten Proben diese Strukturen aufwiesen. Die übrigen Hautstrukturen und die NaCl-Kontrolle waren negativ.
- **250ng** wurden in 1 Transplantat appliziert. Darin war HBD-3 negativ. Die Proben der NaCl-Kontrolle wiesen keine menschliche Epidermis auf; somit war eine Expression von HBD-3 nicht beurteilbar.

HBD-3 – ISH	IFN-γ	50ng	100ng	150ng	250ng
	Haut- strukturen	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl
	Str. corneum	0	0	0	0
		0	0	0	nbb
	Str. granulosum	0	+	0 - +++	0
		0	+	0	nbb
	Str. spinosum	0	++	++ - +++	0
		0	+ - f++	0	nbb
	Str. basale	0	0	+ - ++	0
		0	0	0	nbb
	Infiltrat	0	0	0	0
		0	0	0	nbb
	Endothel	0	0	0	0
		0	0	0	nbb
	Schweißdrüsen	0	0 – na	+ - na	0
		0	0 – na	0 – na	nbb
	Haarfollikel	0	0	++ - na	0
		0	0 – na	0	nbb
	<b>N Hautproben:</b>	2	2	3	1 *
	Anmerkungen:	* : keine Epidermis im NaCl-Transplantat			

Tab. 19 Nachweis von **HBD-3** im Transplantat **nach Injektion von IFN-γ** (ISH);  
 +: schwach; ++: mäßig; +++: stark; f: fokal; 0: negativ; na: Struktur in Präparat nicht vorhanden; nbb: nicht beurteilbar

**Zusammenfassung: HBD-3** ist nach Injektion von IFN-γ 150ng in der **ISH** deutlich verstärkt in Str. spinosum, granulosum, basale und teils auch in Schweißdrüsen und Haarfollikeln nachweisbar.

#### 4.5.2.2 Immunhistochemischer Nachweis (IHC) (Tab. 20-22)

Nach Injektion von IFN- $\gamma$  (50, 100, 150 und 250ng) war **PSO** in der IHC wie folgt exprimiert (s. Tab. 20, Abb. 9, 30 und 31):

- Jeweils **50ng** wurden in 2 Transplantate appliziert. In diesen war PSO im Str. corneum schwach bis mäßig positiv und in Str. granulosum sowie spinosum mäßig bis stark positiv. Schweißdrüsen und Haarfollikel waren in den untersuchten Proben von IFN- $\gamma$ - und NaCl-injiziertem Transplantat nicht vertreten. In den Proben eines NaCl-Transplantates war keine menschliche Epidermis vorhanden. Die NaCl-Kontrolle war für PSO in Str. corneum und spinosum schwach und im Str. granulosum mäßig positiv.
- Jeweils **100ng** wurden in 2 Transplantate appliziert. Von diesen war in den Proben eines Transplantates keine menschliche Haut nachweisbar. Im verbleibenden Transplantat ließ sich kein PSO nachweisen. Die NaCl-Kontrollen waren für PSO negativ.

PSO – IHC	IFN- $\gamma$	50ng	100ng	150ng	250ng
	Haut- strukturen	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl
	Str. corneum	+ - ++ +	0 0	+ - ++ +	+ 0
	Str. granulosum	++ - +++ ++	0 0	+ - ++ +	+ 0
	Str. spinosum	++ - +++ +	0 0	+ - f++ 0 - +	0 0
	Str. basale	0 0	0 0	0 0	0 0
	Infiltrat	0 0	0 0	0 0	0 0
	Endothel	0 0	0 0	0 0	0 0
	Schweißdrüsen	Na Na	0 0 - na	0 - ++ na	+ na
	Haarfollikel	Na Na	0 0	0 - + 0 - na	+ 0
<b>N Hautproben:</b>		2 *	2 **	3	1
Anmerkungen:		*: keine Epidermis in einem NaCl – Transplantat ** : keine Epidermis in einem IFN- $\gamma$ - Transplantat			

Tab. 20 Nachweis von **PSO** im Transplantat **nach Injektion von IFN- $\gamma$**  (IHC);

+: schwach; ++: mäßig; +++: stark; f: fokal; 0: negativ; na: Struktur in Präparat nicht vorhanden

- Jeweils **150ng** wurden in 3 Transplantate appliziert. Darin war PSO in Str. corneum und granulosum schwach bis mäßig positiv und im Str. spinosum schwach bis fokal mäßig positiv nachzuweisen. PSO war in Schweißdrüsen nicht bis mäßig und in den Haarfollikeln nicht bis schwach nachweisbar. In der NaCl-Kontrolle war PSO in Str. corneum und granulosum schwach und im Str. spinosum nicht bis schwach vorhanden. Die übrigen untersuchten Hautstrukturen waren negativ.
- **250ng** wurden in 1 Transplantat appliziert. In diesem war PSO in Str. corneum und granulosum, Schweißdrüsen und Haarfollikel schwach positiv. Die übrigen Hautstrukturen und die NaCl-Kontrolle waren negativ.

**Zusammenfassung:** Die Expression von **PSO** ist in der **IHC** deutlich erhöht nach Injektion von IFN- $\gamma$  50ng und abgeschwächt ab 150ng in Str. spinosum, granulosum, corneum und teilweise in Schweißdrüsen und Haarfollikeln nachweisbar.

HBD-2 – IHC	IFN- $\gamma$	50ng	100ng	150ng	250ng
	Haut- strukturen	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl
	Str. corneum	0	0	0	0
		0	0	0	0
	Str. granulosum	0	0	0	0
		0	0	0	0
	Str. spinosum	0	0	0	0
		0	0	0	0
	Str. basale	0	0	0	0
		0	0	0	0
	Infiltrat	0	0	0	0
		0	0	0	0
	Endothel	0	0	0	0
		0	0	0	0
	Schweißdrüsen	0	0	na	0
		0	0 - na	na	0
	Haarfollikel	0	0	na	0
		0	0 - na	na	0
	<b>N Hautproben:</b>	2	2	3	1

Tab. 21 Nachweis von **HBD-2** im Transplantat **nach Injektion von IFN- $\gamma$**  (IHC);  
 +: schwach; ++: mäßig; +++: stark; f: fokal; 0: negativ; na: Struktur in Präparat nicht vorhanden

**HBD-2** war nach Injektion von IFN- $\gamma$  (50, 100, 150 und 250ng) in der IHC wie folgt exprimiert (s. Tab. 21, Abb.10, 32 und 33):

- Jeweils **50ng** und **100ng** wurden in 2 Transplantate, **150ng** wurden in 3 Transplantate und **250ng** wurde in ein Transplantat appliziert. In diesen und den dazugehörenden NaCl-Kontrollen war kein HBD-2 nachweisbar.

In den parallel geführten Positivkontrollen mit Präparaten von Psoriasis und atopischem Ekzem war HBD-2 nachzuweisen. Dies entspricht den Angaben in der Literatur (Nomura et al. 2003).

**HBD-3** war nach Injektion von IFN- $\gamma$  (50, 100, 150 und 250ng) in der IHC wie folgt exprimiert (s. Tab. 22, Abb. 11, 34 und 35):

- Jeweils **50ng** wurden in 2 Transplantate appliziert. Hierin war HBD-3 im Str. granulosum nicht bis mäßig nachweisbar. Schweißdrüsen und Haarfollikel waren in

HBD-3 – IHC	IFN- $\gamma$	50ng	100ng	150ng	250ng
	Haut- strukturen	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl
	Str. corneum	0	0	0	0
		0	0	0	0
	Str. granulosum	0 - ++	+ - ++	+ - ++	f+
		0	0 - +	0	0
	Str. spinosum	0	+	+ - ++	0
		0	0	0 - +	0
	Str. basale	0	0	0	0
		0	0	0	0
	Infiltrat	0	0	0	0
		0	0	0	0
	Endothel	0	0	0	0
		0	0	0	0
	Schweißdrüsen	na	0 - na	na	na
		na	0 - na	na	na
	Haarfollikel	na	0 - na	na	0
		na	0 - na	na	na
	<b>N Hautproben:</b>	2 *	2	3	1
	Anmerkungen:	* : keine Epidermis in einem NaCl-Transplantat			

Tab. 22 Nachweis von **HBD-3** im Transplantat **nach Injektion von IFN- $\gamma$**  (IHC);  
+: schwach; ++: mäßig; +++: stark; f: fokal; 0: negativ; na: Struktur in Präparat  
nicht vorhanden

den Proben der IFN- $\gamma$ - und NaCl-injizierten Transplantate nicht vorhanden. HBD-3 war in den übrigen untersuchten Hautstrukturen und der NaCl-Kontrolle negativ. In den Proben eines NaCl-Transplantates war keine menschliche Epidermis vorhanden.

- Jeweils **100ng** wurden in 2 Transplantate appliziert. HBD-3 war in diesen im Str. granulosum schwach bis mäßig und im Str. spinosum schwach positiv nachzuweisen. In der NaCl-Kontrolle war HBD-3 im Str. spinosum nicht bis schwach nachweisbar. Die übrigen Hautstrukturen waren negativ.

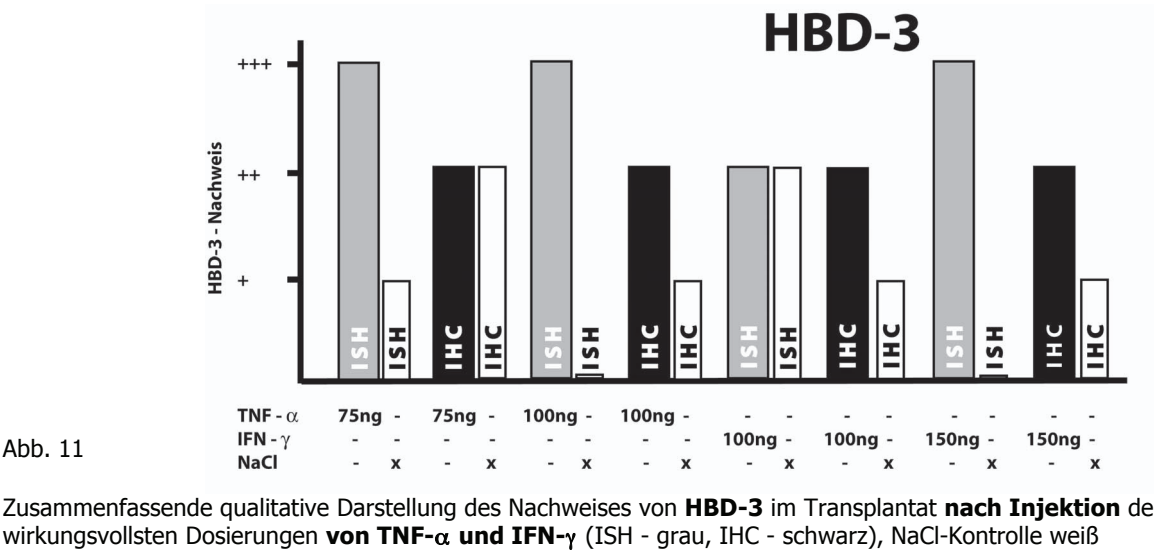
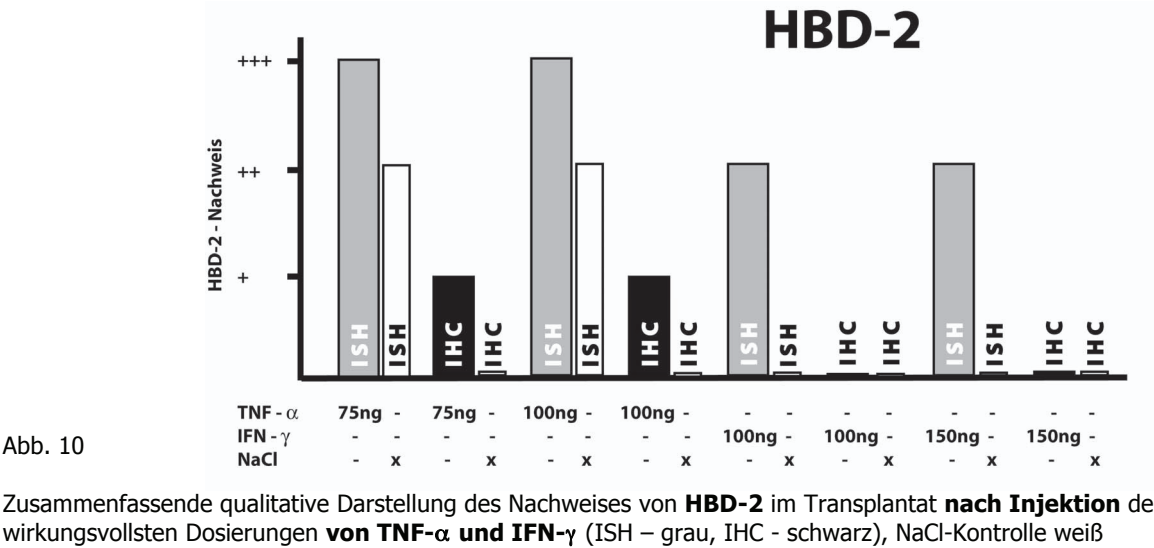
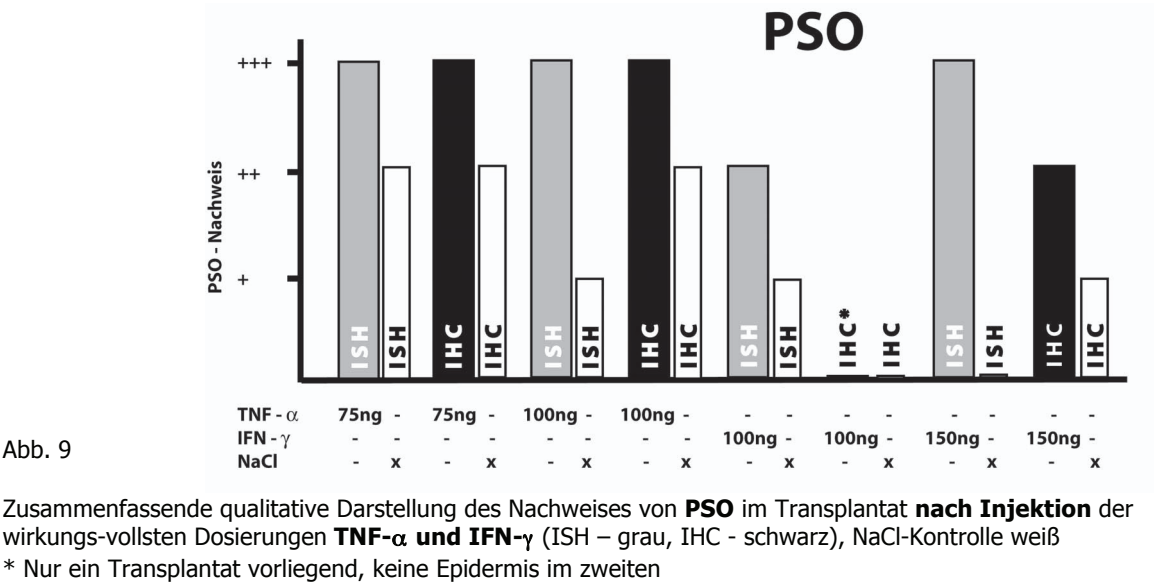
- Jeweils **150ng** wurden in 3 Transplantate appliziert. HBD-3 war darin in Str. granulosum und spinosum schwach bis mäßig positiv. In den Proben der IFN- $\gamma$ - und NaCl-injizierten Transplantate waren Schweißdrüsen und Haarfollikel nicht vorhanden. In der NaCl-Kontrolle war HBD-3 im Str. spinosum nicht bis schwach positiv nachweisbar. Der HBD-3-Nachweis in den übrigen Hautstrukturen war negativ.

- **250ng** wurde in 1 Transplantat appliziert. Darin war HBD-3 im Str. granulosum schwach positiv bei fokaler Verteilung. Schweißdrüsen waren in den IFN- $\gamma$ -injizierten Proben nicht vorhanden, die übrigen Strukturen für HBD-3 negativ. Die Proben der NaCl-Kontrolle wiesen weder Schweißdrüsen noch Haarfollikel auf. In den übrigen untersuchten Strukturen gelang kein Nachweis für HBD-3.

**Zusammenfassung: HBD-3** war nach Injektion von IFN- $\gamma$  in der **IHC** ab 50ng vermehrt im Str. granulosum und bei 100 und 150ng zusätzlich vermehrt im Str. spinosum exprimiert.

#### **4.5.3 Zusammenschau nach Injektion mit TNF- $\alpha$ und IFN- $\gamma$**

Es folgt eine gebündelte qualitative grafische Darstellung der maximal nachgewiesenen Expression von PSO, HBD-2 und -3 im Transplantat nach Zytokininjektion. Die Hautstrukturen Str. granulosum, spinosum, basale, Endothel, entzündliches Infiltrat, Schweißdrüsen und Haarfollikel werden zusammenfassend dargestellt.





#### **4.5.4 TNF- $\alpha$ und IFN- $\gamma$ in Kombination**

An 3 Transplantaten wurde eine Injektion mit einer Kombination von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  zu gleichen Teilen durchgeführt. In eines wurden je 25ng TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  und in 2 je 50ng TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  injiziert.

Bei den AP HBD-2 und HBD-3 war weder auf RNA-Ebene mittels ISH noch auf Protein-Ebene mittels IHC eine Veränderung der Expression im Vergleich zur NaCl-Kontrolle festzustellen (s. Tab. 22 und 23, Anhang).

#### **4.5.5 TNF- $\alpha$ und IL-13 in Kombination**

In 4 Transplantate wurde eine Kombination von 50ng TNF- $\alpha$  und 125ng IL-13 injiziert. Für HBD-2 und HBD-3 ließ sich auf RNA-Ebene mittels ISH im zytokin-injizierten Transplantat eine leicht schwächere Expression als in der NaCl-Kontrolle nachweisen. In der IHC war für die beiden AP HBD-2 und HBD-3 dieses Phänomen nicht zu belegen (s. Tab 24, Anhang).

#### 4.5.6 Fotografische Dokumentation des Nachweises mittels In-situ-Hybridisierung (ISH)

Die spezifische Reaktion von PSO, HBD-2 und -3 zeigt sich mittels blauer Färbung.

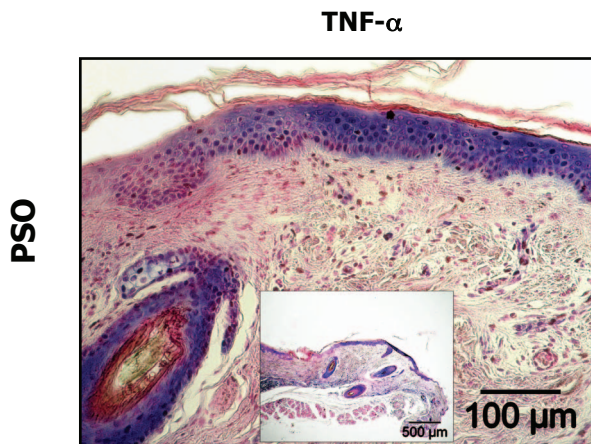


Abb. 12 Injektion von TNF- $\alpha$  100ng, Nachweis von PSO mit ISH

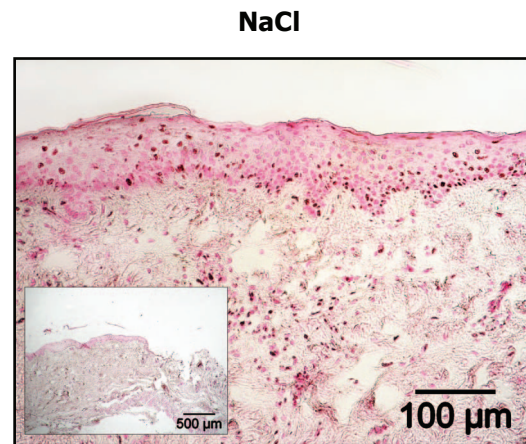


Abb. 13 Injektion von NaCl, Nachweis von PSO mit ISH

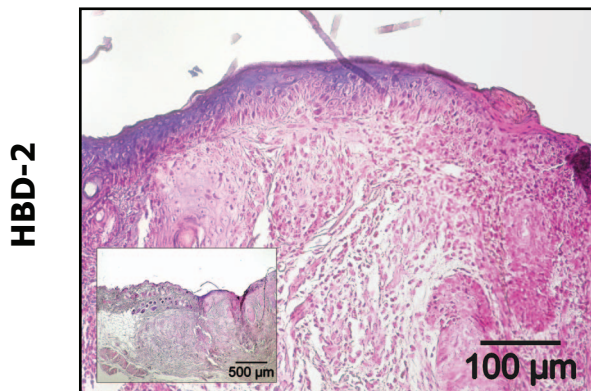


Abb. 14 Injektion von TNF- $\alpha$  100ng, Nachweis von HBD-2 mit ISH

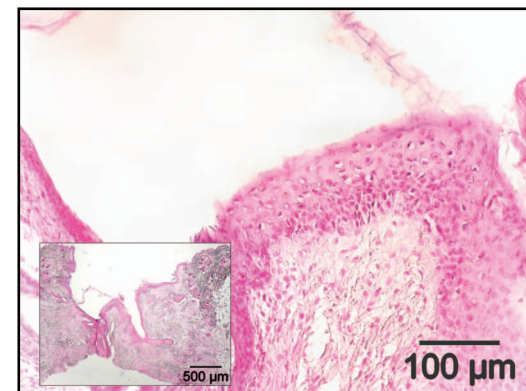


Abb. 15 Injektion von NaCl, Nachweis von HBD-2 mit ISH

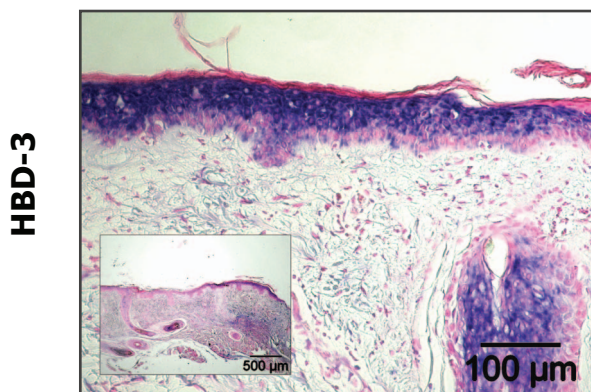


Abb. 16 Injektion von TNF- $\alpha$  100ng, Nachweis von HBD-3 mit ISH

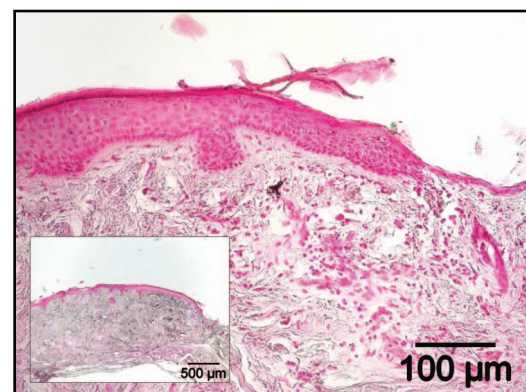


Abb. 17 Injektion von NaCl, Nachweis von HBD-3 mit ISH



**IFN- $\gamma$**

**NaCl**

**PSO**

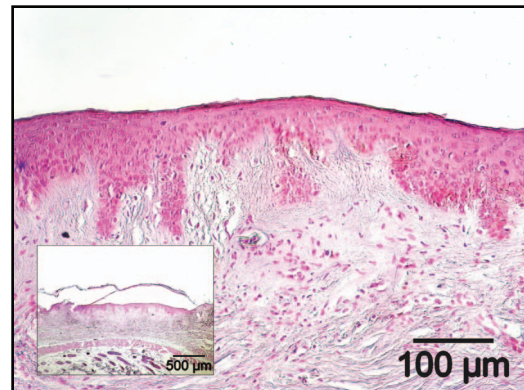
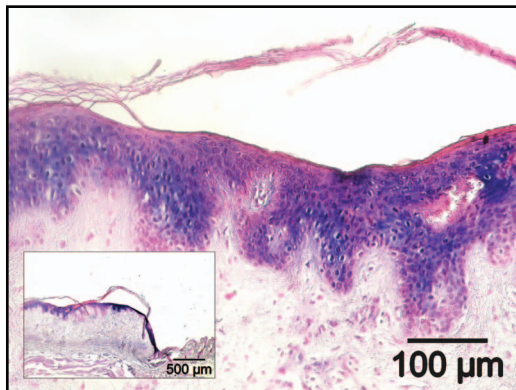


Abb. 18 Injektion von IFN- $\gamma$  150ng, Nachweis von PSO mit ISH

Abb. 19 Injektion von NaCl, Nachweis von PSO mit ISH

**HBD-2**

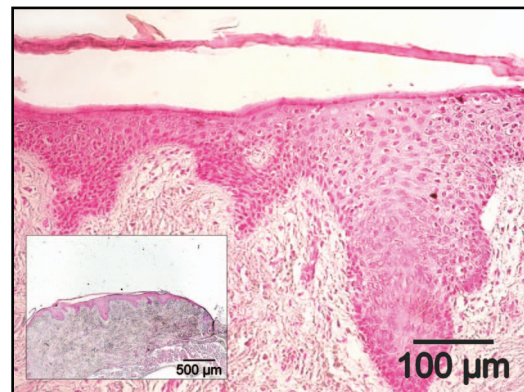
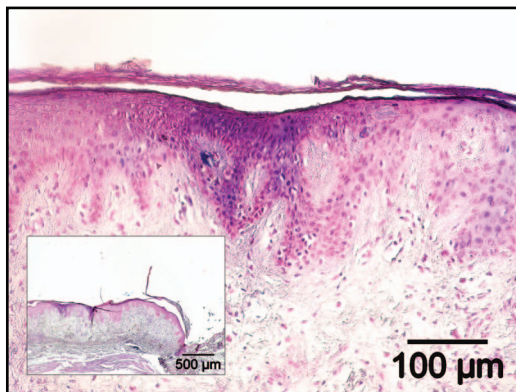


Abb. 20 Injektion von IFN- $\gamma$  150ng, Nachweis von HBD-2 mit ISH

Abb. 21 Injektion von NaCl, Nachweis von HBD-2 mit ISH

**HBD-3**

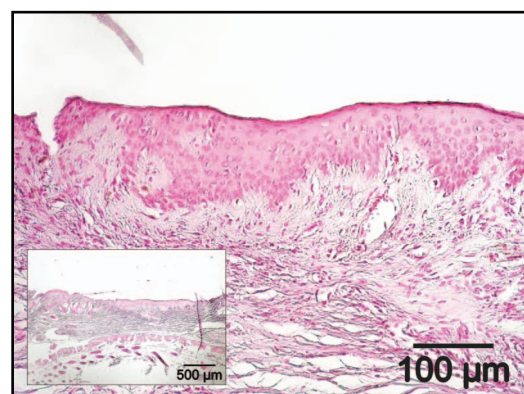
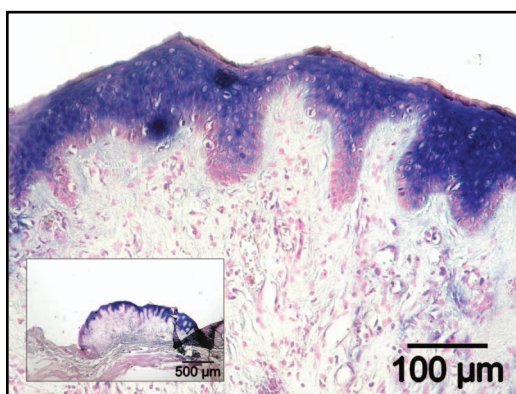


Abb. 22 Injektion von IFN- $\gamma$  150ng, Nachweis von HBD-3 mit ISH

Abb. 23 Injektion von NaCl, Nachweis von HBD-3 mit ISH

#### 4.5.7 Fotografische Dokumentation des Nachweises mittels immunhistochemischer Methode (IHC)

Die spezifische Reaktion von PSO, HBD-2 und -3 zeigt sich mittels roter Färbung.

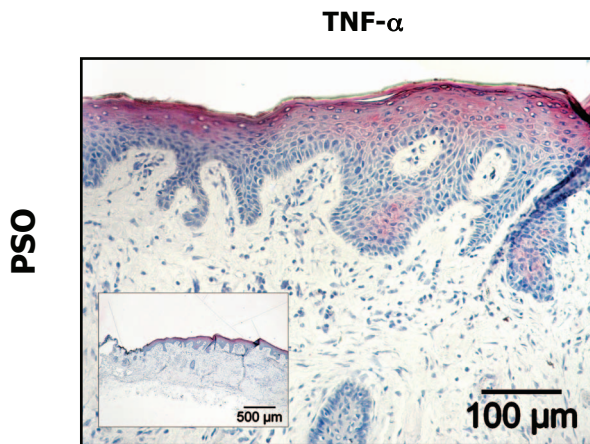


Abb. 24 Injektion von TNF- $\alpha$  100ng, Nachweis von PSO mit IHC

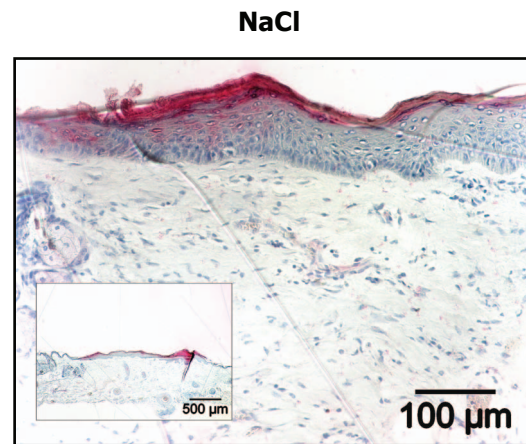


Abb. 25 Injektion von NaCl, Nachweis von PSO mit IHC

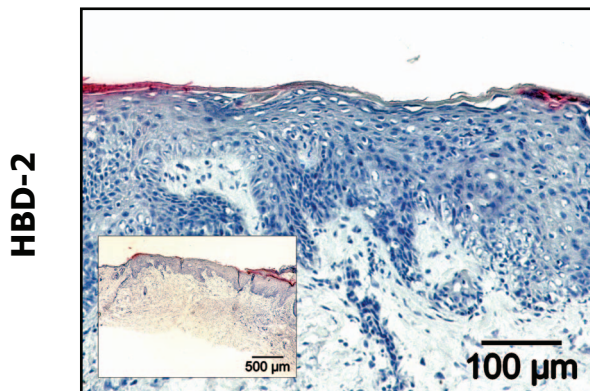


Abb. 26 Injektion von TNF- $\alpha$  150ng, Nachweis von HBD-2 mit IHC

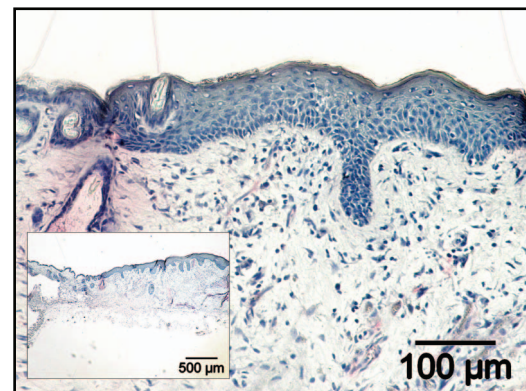


Abb. 27 Injektion von NaCl, Nachweis von HBD-2 mit IHC

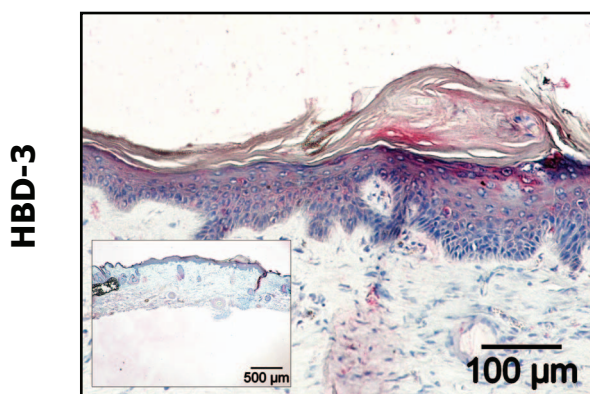


Abb. 28 Injektion von TNF- $\alpha$  100ng, Nachweis von HBD-3 mit IHC

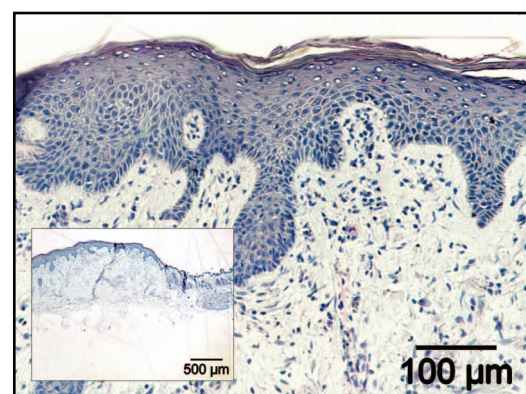


Abb. 29 Injektion von NaCl, Nachweis von HBD-3 mit IHC



**IFN- $\gamma$**

**NaCl**

**PSO**

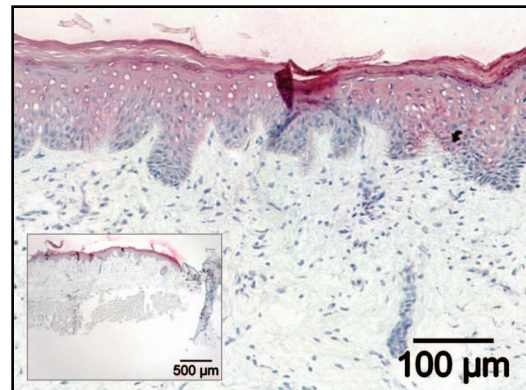
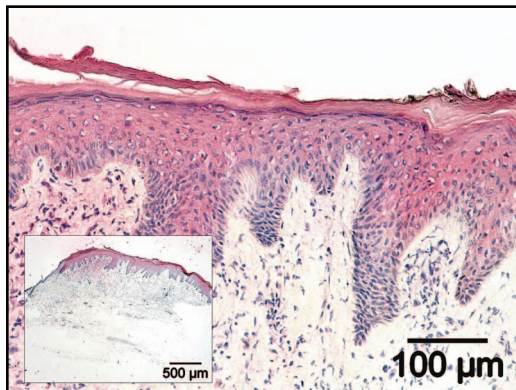


Abb. 30 Injektion von IFN- $\gamma$  150ng, Nachweis von PSO mit IHC

Abb. 31 Injektion von NaCl, Nachweis von PSO mit IHC

**HBD-2**

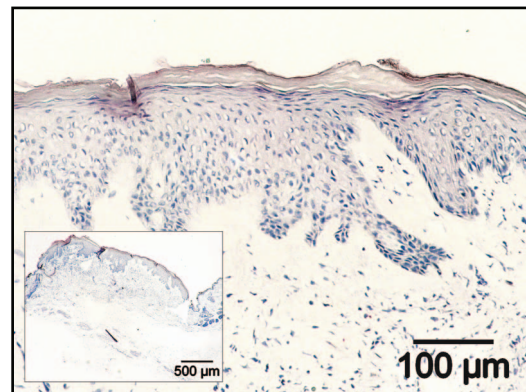
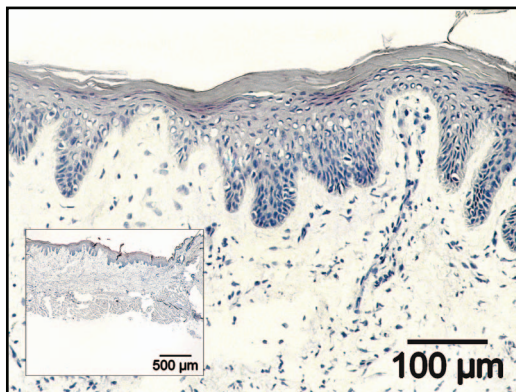


Abb. 32 Injektion von IFN- $\gamma$  150ng, Nachweis von HBD-2 mit IHC

Abb. 33 Injektion von NaCl, Nachweis von HBD-2 mit IHC

**HBD-3**

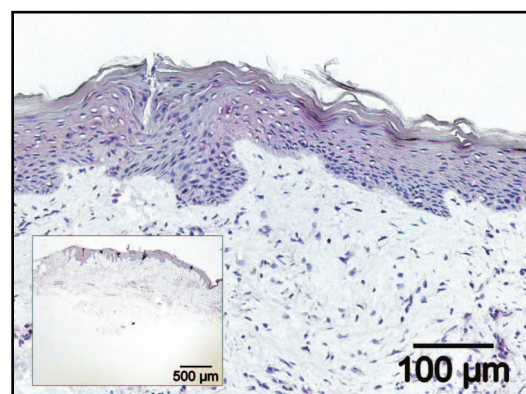
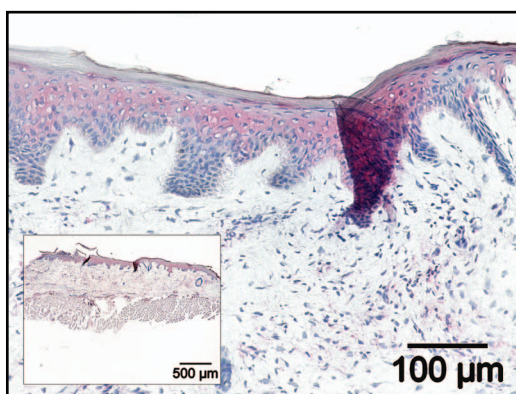


Abb. 34 Injektion von IFN- $\gamma$  150ng, Nachweis von HBD-3 mit IHC

Abb. 35 Injektion von NaCl, Nachweis von HBD-3 mit IHC



## 5 DISKUSSION

Vorkommen und Wirkung antimikrobieller Peptide wurde schon an vielen unterschiedlichen Organismen und Organen untersucht. An der Haut, die ständig in direktem Kontakt zur Umwelt steht, spielen AP eine bedeutende Rolle bei der Abwehr mikrobieller Erreger. Die klinische Erfahrung, dass Patienten mit atopischer Dermatitis (AD) häufiger an Infektionen der Haut leiden als Patienten mit Psoriasis (Nomura et al. 2003), kann durch das unterschiedlich starke Vorkommen der AP HBD-2, HBD-3 und LL-37 bei beiden Krankheitsbildern erklärt werden. Hierbei kommt der zytokinvermittelten Expression von AP eine bedeutende Rolle zu: So bewirken TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  eine verstärkte Expression von HBD-2 und HBD-3, wogegen IL-4 und -13 diese abschwächen (s. Kap. 1.4). Diese Erkenntnisse führen zur Überlegung, ob die Bildung AP durch Zytokine auch therapeutisch umgesetzt werden kann, um den Verlauf lokaler oder systemischer, durch Viren oder Bakterien bedingter, Infektionen positiv zu beeinflussen.

So gelang z.B. der Nachweis einer signifikanten Erhöhung der Expression von HBD-3 nach Neutralisierung der TH-2 Zytokine IL-4, -10 und -13 in Hautproben von AD-Patienten in vitro. Nach der Kultur läsionaler Haut über 24 Stunden mit Anti-IL-4-, -10- und -13-Antikörpern erfolgte die Messung der isolierten RNA mittels RT-PCR (Howell et al. 2006). Quinones-Mateu et al. zeigten eine bis 78fach stärkere Expression von HBD-2- und HBD-3-RNA an in-vitro-Kulturen humaner Mundschleimhautzellen durch die HI-Virus-1 Typen X4 und R5 (2003). 48 Stunden nach Infektion der Zellkulturen mit den HI-Virus-1 Typen X4 und R5 wurde die HBD-2 und -3 RNA-Expression mittels PCR gemessen. Desweiteren konnten sie eine direkte dosisabhängige antivirale Aktivität von HBD-2 und -3 gegen die HI-Virus Typen X4 und R5 nach in-vitro-Inkubation über 48 Stunden bestätigen. Die in-vitro-Identifikation von HBD-3 als endogener direkter Antagonist am CXCR4-Korezeptor, den der HI-Virus 1 Typ X4 verwendet um menschliche Zellen zu infizieren, könnten in Zukunft eine bedeutende Rolle in der Entwicklung künftiger Medikamente zur Behandlung von AIDS spielen (Feng et al. 2006).

Neben einer zentralen Rolle am Entzündungsgeschehen scheinen die AP eine weitere, davon unabhängige Rolle bei der Entstehung humaner Tumore zu spielen.

Psoriasin (PSO) ist deutlich vermehrt in präkanzerösen Hautläsionen sowie Plattenepithel- und Basalzellkarzinomen nachzuweisen (Moubayed et al. 2007). Enerbäck et al. gelang es ebenfalls PSO deutlich erhöht im hochdifferenzierten duktales Carcinoma in situ der Mamma im Vergleich zu gesundem Mammagewebe auf RNA-Ebene (mittels in-situ-Hybridisierung) und auf Protein-Ebene (mittels immunhistochemischer Methode) nachzuweisen (2002). Kersting et al. postulieren PSO als Tumormarker für das orale Plattenepithelcarcinom in frühen Entwicklungsstadien, da es ihnen gelungen ist, eine vom Differenzierungsstadium des Tumors abhängige, PSO-RNA-Expression (mittels RT-PCR) nachzuweisen (2009). In Basalzellkarzinomen, die zu den häufigsten bösartigen Tumoren der Haut zählen, ist HBD-1 schwächer und HBD-2 stärker exprimiert als in gesunder Haut (Gamblicher et al. 2006). Durch eine Beeinflussung der AP-Bildung mittels Zytokinen ist eine Änderung von Proliferation und damit Progression denkbar und therapeutisch interessant.

In der vorliegenden Arbeit wurden die AP HBD-2, HBD-3 und Psoriasin und deren Modulierbarkeit mittels der Zytokine  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IFN-}\gamma$  und IL-13 in vivo untersucht. Dies wurde an humaner Haut, die hierfür zuvor aus ethischen Gründen auf NOD-SCID-Mäuse transplantiert worden war, durchgeführt.

In-vivo-Studien, und somit auch dieses Modell, sind sehr schwer zu interpretieren, da eine Vielzahl von Faktoren das System beeinflussen können. Jedoch geben in-vivo-Studien die komplexen Bedingungen des menschlichen Organismus mit seiner spezifischen Physiologie meist besser wieder als in-vitro-Studien. Im hier verwendeten Modell ist die Produktion AP eine genuine Leistung der Epidermis, ohne ein vorhandenes intaktes humanes Immunsystem nutzen zu können. Da Haut ex vivo generell nur bedingt vital zu halten ist, fungiert hier die Maus als lebender Träger. In-vitro-Untersuchungen haben häufig einen experimentellen, modellhaften Charakter und damit ist ihre Übertragbarkeit auf in-vivo-Verhältnisse begrenzt.



## **5.1 Ist das xenogene SCID-Maus-Transplantationsmodell für die in-vivo-Studie antibiotischer Peptide geeignet?**

Erste erfolgreiche Versuche, humane Haut auf Mäuse zu transplantieren, sind schon 1951 beschrieben (Billingham et al. 1951). Mit der SCID-Maus als Transplantatempfänger ergaben sich optimierte Bedingungen. Durch das Fehlen funktionsfähiger T- oder B-Lymphozyten besitzt diese weder ein humorales noch ein zelluläres Immunsystem. Zum einen kam es zu deutlich weniger Transplantatabstoßungen, zum anderen war ein Modell gefunden worden, in dem die transplantierte Haut ihr histologisches Erscheinungsbild und einen Teil der Gefäßstruktur über längere Zeit bewahrt (Boehncke 1999; Nickoloff et al. 1995). Die Eignung des Modells zur Untersuchung von Entzündungsprozessen an humaner Haut belegte Yan et al. (1993 und 1994): Nach intradermaler Injektion von TNF- $\alpha$  in auf SCID-Mäuse transplantierte humane Haut gelang es, signifikant erhöhtes humanes E-Selectin immunhistologisch nachzuweisen. Die Expression war innerhalb von einer Stunde nachweisbar und erreichte ihr Maximum nach 2 Stunden. Innerhalb 2 Stunden war ebenso die Migration einer großen Anzahl von Maus-Leukozyten in das Transplantat zu verzeichnen. Mittels intravenöser Injektion eines Antikörpers gegen humanes E-Selectin konnte die Migration von Maus-Leukozyten und die Migration intravenös verabreichter humaner Leukozyten unterbunden werden.

In der vorliegenden Arbeit waren 64 der durchgeführten 76 Transplantationen erfolgreich. Bei Betrachtung der 12 nicht erfolgreichen Transplantationen anhand Tab. 5 (S. 36) könnte man postulieren, dass die Transplantationsmethode 1 (2 kreisrunde Transplantate mit einem Durchmesser von 0,8 cm pro Versuchstier) dafür ursächlich ist. Jedoch stammen 8 der 11 abgestoßenen und mit Transplantationsmethode 1 transplantierten Hautproben von einer Person, bei der keines der Transplantate erfolgreich war (s. Tab. 6, S. 37). Hier könnten Eigenschaften des Transplantates wie z.B. die Entnahmestelle Stirn, Hautzustand, Kontamination, Alter der Spenderin (94 Jahre) und Vorerkrankungen für den fehlenden Erfolg der Transplantation verantwortlich sein. Auffallend ist, dass die abgestoßenen Transplantate überwiegend von Spendern hohen Lebensalters stammen (s. Tab. 3 und 6, S. 17f und 37). Einen schlechteren Erfolg bei Verwendung

humaner Haut älterer Spender beschreibt Yan et al. im Vergleich zu Spenderhaut von Neugeborenen bei der Transplantation von humanen Hauttransplantaten mit einem Durchmesser von 1,5 cm auf SCID-Mäuse (1993). Insbesondere werden die stärkere Dicke und die schwächere Gefäßversorgung bei Transplantaten älterer Spender für die schlechteren Transplantationsergebnisse verantwortlich gemacht. Ob die Transplantationsmethoden 2 (4 kreisrunde Transplantate mit einem Durchmesser von 0,8 cm pro Versuchstier) und 3 (2 rechteckige Transplantate der Größe 1,5 x 1 cm) zu besseren Ergebnissen führen, lässt sich anhand der jeweils geringen Fallzahlen dieser beiden Methoden nicht sicher beurteilen.

84,2% erfolgreiche Transplantationen in der vorliegenden Arbeit sprechen für eine gute Umsetzung der angewandten Methode. Das erreichte Ergebnis liegt über den in der Literatur beschriebenen Erfolgen von 80% (Tahtis et al. 2003) und 83,3% (Takizawa et al. 1996).

Die Schrumpfung transplanteder Hautproben auf dem Versuchstier ist ein bekanntes Phänomen. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Transplantationen wurde ein besseres Ergebnis als in vergleichbaren publizierten Versuchsreihen erzielt: Mit 30-34% Transplantatschrumpfung liegt diese Arbeit deutlich vor der von Takizawa et al. mit 50% Transplantatschrumpfung bei SCID-Mäusen (1996).

In Anbetracht der hier gemachten Erfahrungen, dass bei einigen Versuchstieren während der nachfolgenden Untersuchungen mittels ISH und IHC die gewonnenen Proben völlig aufgebraucht waren, sollten bei Folgetransplantationen größere Hautproben auf die Versuchstiere verbracht werden, um mehr Spielraum für die Untersuchungen zu haben.

## **5.2 Der Nachweis antibiotischer Peptide in der Spenderhaut vor und nach Transplantation**

In der Aufarbeitung der Spenderhaut vor und nach Transplantation (s. Kap. 4.2 und 4.3, S. 38 ff) ließ sich die Expression der 3 untersuchten AP Psoriasin (PSO), HBD-2 und HBD-3 sowohl auf RNA-Ebene mittels in-situ-Hybridisierung als auch auf Protein-Ebene mittels immunhistochemischer Nachweismethode nachweisen. Das heißt, die Eigenschaften der humanen Haut bzgl. der Immunreaktivität vor und nach

Transplantation bleiben erhalten. Insgesamt zeigt sich ein ähnliches Verteilungsmuster der AP vor und nach Transplantation (s. Tab. 7, 8, 9 und 10, S. 39 ff).

Auffallend ist jedoch eine Diskrepanz bei der nachgewiesenen Expression von HBD-2 zwischen RNA- und Protein-Ebene: Während sich HBD-2 mittels ISH auf RNA-Ebene stärker und in mehr Lokalisationen nachweisen ließ, konnte dieses auf Protein-Ebene mittels IHC in schwächerer Ausprägung beobachtet werden. Dieses Phänomen ist noch deutlicher in der transplantierten Spenderhaut ausgeprägt.

Für den ungleichen Nachweis der Expression von HBD-2 auf der RNA- und Proteinebene wird im Rahmen dieser Arbeit angenommen, dass der Verhornungsgrad der vorliegenden Hautproben hierfür ursächlich ist: Bei schwach oder nicht verhornenden Epithelien kann ein Verlust von HBD-2-RNA oder -Protein kurz nach der Produktion durch oberflächliche Diffusion oder während der Probenaufarbeitung durch Auswaschung den Nachweis abschwächen. Ebenso kann das Andocken von Trägermolekülen der jeweiligen Nachweismethode durch eine stärkere Verhornung der Epithelien negativ beeinflusst werden (Yoshihiro et al. 2001).

Außerdem könnte im gewählten Zeitfenster von 24 Stunden zwischen Zytokininjektion und Transplantatentnahme die RNA-Expression bereits erfolgt sein, die Umschreibung in Protein jedoch noch nicht stattgefunden haben.

Das hier in der ISH nachgewiesene Verteilungsmuster von HBD-2-RNA innerhalb der Epidermisschichten (Str. basale < spinosum = granulosum) mit den Adnexstrukturen (Haarfollikel und Schweißdrüsen) entspricht den Ergebnissen von Ali et al. (2001) an gesunder menschlicher Haut. Und es spiegelt die Annahme wieder, dass die Expression von AP in der Haut in den oberen Hautschichten verstärkt ist, d. h. an dem Ort, an dem die Immunreaktion stattfindet.

Die intradermale Verteilung von PSO und HBD-3 ist annähernd gleich zwischen ISH und IHC. Das Vorkommen von HBD-3 mit Schwerpunkt in Str. granulosum und spinosum sowie deutlich schwächerer Ausprägung im Str. basale entspricht den Angaben in der Literatur (Sawamura et al. 2005 und de Jongh et al. 2005).

Die Untersuchungen von Di Nuzzo et al. (2000) und Gläser et al. (2009) bestätigen den Nachweis von PSO mit Schwerpunkt in Str. granulosum und spinosum. Der starke Nachweis von PSO in der vorliegenden Arbeit auf Protein-Ebene im Str.

corneum in der IHC, der in der ISH nicht reproduzierbar war, wird auf folgenden Zusammenhang zurückgeführt: Während RNA vermehrt in den mittleren und unteren Hautschichten zu finden ist, akkumuliert das gebildete Protein nach seiner Genese in den oberflächlichen Hautschichten.

Die Expression von PSO weist eine Korrelation mit UVB-Exposition auf. Di Nuzzo et al. (2000) wies eine verstärkte Expression von PSO in gesunder Haut nach UVB-Bestrahlung nach. Nach einmaliger Bestrahlung mit der vierfachen minimalen Erythem-Dosis von UVB ließ sich nach 24 Stunden eine deutliche Zunahme von PSO-RNA nachweisen. Diese war über 10 Tage annähernd konstant messbar. Die in dieser Arbeit verwendeten Transplantate stammen fast ausschließlich von lichtexponierten Arealen (s. Tab. 3, S. 17f). Somit könnte die ursprüngliche Lokalisation der verwendeten Transplantate beim jeweiligen Spender in Zusammenhang mit dem deutlichen Nachweis von PSO stehen. Die in der transplantierten Haut tendenziell schwächer ausgeprägte Expression von PSO kann auf den Zeitraum zurückgeführt werden, in dem die Haut nach Transplantation keinem natürlichen UV-Licht mehr ausgesetzt war.

### **5.3 Führt die Injektion von Zytokinen zu einer veränderten Expression von antibiotischen Peptiden im Transplantat?**

Eine verstärkte Expression der AP HBD-2 und HBD-3 konnte Nomura et al. in vitro nach vierundzwanzigstündiger Stimulation von kultivierten primären humanen Keratinozyten mit den Zytokinen TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  auf RNA-Ebene nachweisen (2003). Noch potenter war die kombinierte Stimulation mit TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ . Außerdem zeigte sich eine Abschwächung der Expression von HBD-2 und HBD-3 nach Exposition der Keratinozyten mit dem TH-2-Zytokin IL-13 einzeln oder in Kombination mit TNF- $\alpha$  oder IFN- $\gamma$ . Diese Ergebnisse konnten auch durch Albanesi et al. bestätigt werden (2007). Albanesi zeigte eine vermehrte Expression von HBD-2 und HBD-3 nach Inkubation mit TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  und eine verminderte Expression nach Inkubation mit IL-13 bei in-vitro-Stimulation von kultivierten primären humanen Keratinozyten mittels RT-PCR. Dies wurde für die 3 genannten Zytokine einzeln wie auch in Kombination gezeigt. Der Inkubationszeitraum betrug hier 24 Stunden.

Eine verstärkte Expression von HBD-3 nach achtundvierzigstündiger in-vitro-Stimulation primärer humaner Keratinozyten mit Transforming growth factor - alpha (TGF- $\alpha$ ) konnte Sorensen et al. (2003) auf RNA- und Protein-Ebene nachweisen. Sorensen zeigte außerdem, dass die Stimulation mit einem Zytokin (Insulin-like growth factor - 1 (IGF-1)) alleine keine Änderung der Expression bewirken kann. Die Stimulation einer Kombination des gleichen Zytokins mit einem zweiten (IGF-1 und TGF- $\alpha$ ) kann die Expression durchaus um ein vielfaches erhöhen gegenüber der alleinigen Stimulation mit TGF- $\alpha$ .

Für Psoriasin wird eine Verstärkung der Expression durch TNF- $\alpha$  in primären humanen Keratinozyten sowie deren Hemmung durch IL-13 beschrieben (Gläser et al. 2009). Gläser demonstrierte in vitro nach einer sechzehnständigen Stimulation primärer humaner Keratinozyten mit TNF- $\alpha$  einen mehr als dreimal höheren Nachweis (mittels ELISA) von PSO als in der Kontrolle. Die Kombination von TNF- $\alpha$  und IL-13 erbrachte lediglich eine knapp zweifache Erhöhung von PSO.

Beim ductalen Carcinoma in situ (DCIS) der Brustdrüsen wird PSO vermehrt in den Epithelzellen der Brustdrüse gebildet. Bei einzelnen Tumor-Zelllinien des DCIS führt IFN- $\gamma$  bei in-vitro-Untersuchungen zu einer Reduktion von PSO, bei anderen Tumorzelllinien war PSO jedoch nicht beeinflussbar (Petersson et al. 2007). Dass die Bildung von PSO durch IFN- $\gamma$  vermindert wird, stützen die Erkenntnisse von Di Nuzzo et al. (2000 und 2002). Diese beschreiben eine Reduktion des IFN- $\gamma$ -Nachweises in humaner Epidermis durch UVB-Strahlung, welche nachweislich die Expression von PSO erhöht.

In der vorliegenden Arbeit weisen die untersuchten AP PSO, HBD-2 und HBD-3 nach Injektion der Zytokine TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-13 eine gleiche Verteilung innerhalb der Epidermis und Adnexstrukturen bei unterschiedlicher Intensität auf wie in der Spenderhaut ohne Zytokin-Injektion (s. Kap. 5.2).

### 5.3.1 Psoriasin nach Injektion von TNF- $\alpha$ und IFN- $\gamma$

Die Injektion von TNF- $\alpha$  in dieser Arbeit führt zu einer leicht vermehrten Expression von PSO in Str. granulosum, spinosum sowie Haarfollikeln und seltener Schweißdrüsen auf RNA- und Protein-Ebene (s. Tab. 11 und 14, S. 45, 50 und Abb. 9, S. 62 und Abb. 12, 13, 24 und 25, S. 64ff). Dies entspricht den in Kap. 5.3 beschriebenen in-vitro-Ergebnissen von Gläser et al. (2009).

Die auf Proteinebene (IHC) nachgewiesene Expression von PSO nach Injektion von IFN- $\gamma$  nimmt bei höherer IFN- $\gamma$ -Dosierung ab (s. Tab. 20, S. 58). Diese Ergebnisse decken sich mit den zu Beginn dieses Kapitels beschriebenen Ergebnissen, die bei in-vitro-Untersuchungen eine Abschwächung des PSO-Nachweises unter dem Einfluss von IFN- $\gamma$  zeigen. Bei einem Vergleich der vorliegenden Ergebnisse mit der Arbeit von Petersson et al. (2007) sollte jedoch beachtet werden, dass die dort gewonnenen Erkenntnisse an Epithelien der Brustdrüsen in malignem Tumorgewebe erzielt wurden und nicht an, wie in dieser Arbeit verwendeten, gesunder humaner Haut. Desweiteren wurde bei der in-vitro- Stimulation von Petersson eine mehr als doppelt so große Menge IFN- $\gamma$  verwendet und diese über eine Zeitspanne von 48 Stunden.

Eine abgeschwächte Expression von PSO nach IFN- $\gamma$ -Injektion lässt sich allerdings auf RNA-Ebene (ISH) nicht bestätigen (s. Tab. 17, S. 54). Der auf RNA-Ebene fehlende Nachweis von PSO im Stratum corneum (s. Tab. 11 und 17, S. 45 und 54) im Vergleich zur Protein-Ebene (s. Tab. 14 und 20, S. 50 und 58) wurde auch an der nicht manipulierten Spenderhaut in Kap. 5.2 dargestellt. Dieses Ergebnis entspricht der Annahme, dass RNA vornehmlich in den mittleren und unteren Hautschichten zu finden ist, während gebildetes Protein nach seiner Genese in den oberflächlichen Hautschichten akkumuliert. Zusätzlich wird die Diffusion bzw. die Auswaschung von RNA aus dem Str. corneum während der Probenaufarbeitung für den unterschiedlichen Nachweis von PSO auf RNA- und Proteinebene zugrunde gelegt (siehe auch Yoshihiro et al. 2001).

### 5.3.2 HBD-2 nach Injektion von TNF- $\alpha$ und IFN- $\gamma$

Nach Injektion von TNF- $\alpha$  sowie IFN- $\gamma$  in mittlerer Dosierung ist eine leicht verstärkte Expression von HBD-2 auf RNA-Ebene in Str. spinosum, granulosum und basale im Vergleich zu den NaCl-injizierten Präparaten zu verzeichnen. Diese Ergebnisse entsprechen den in-vitro-Ergebnissen der Arbeitsgruppen von Nomura et al. (2003) und Albanesi et al. (2007) (s. Tab. 12 und 18, S. 47, 56).

Eine vermehrte Expression von HBD-2 nach Injektion der beiden Zytokine TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  kann durch die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche auf Protein-Ebene mittels IHC jedoch nicht bestätigt werden (S. Tab. 15 und 21, S. 51, 59, Abb. 10, S. 62, Abb. 26, 27, 32, 33 S. 66 f). In den mitgeführten Positivkontrollen ließen sich HBD-2 Proteine nachweisen. Eine mögliche Erklärung für die nachgewiesene unterschiedliche Expression von HBD-2 auf RNA- und Protein-Ebene könnte in der gewählten Zeitspanne von 24 Stunden zwischen Injektion des Zytokins und Entnahme des modulierten Hauttransplantates liegen. Dieser Zeitraum könnte nicht ausreichend gewesen sein, um bereits genügend nachweisbare Proteinstrukturen zu exprimieren. Desweiteren führten die beiden Arbeitsgruppen Albanesi et al. und Nomura et al. in-vitro-Untersuchungen an kultivierten primären humanen Keratinozyten durch und untersuchten lediglich die Expression von HBD-2 auf RNA-Ebene 24 Stunden nach der Modulation mittels Zytokinen. Ein Nachweis von HBD-2 auf Protein-Ebene wurde in diesen Studien nicht durchgeführt.

Der schwache und fokal unterschiedliche Nachweis von HBD-2 auf Protein-Ebene lediglich im Str. corneum der TNF- $\alpha$ -injizierten Proben könnte auf einer Reaktion wie bei Yoshihiro et al. beschrieben beruhen (2001): Verhornende Hautschichten wie das Str. corneum mit dem angrenzenden Str. granulosum wirken wie eine Grenze bzw. Sammelstelle, welche die Diffusion von HBD-2-Protein aus der Hautprobe verhindern. Somit könnte sich der hier erreichte niedrige Nachweis von HBD-2-Protein in den obersten Hautschichten aus bereits gebildeten Kleinstmengen Protein aus den übrigen Hautschichten generieren.

In den TNF- $\alpha$ -injizierten Transplantaten mit den höheren Dosierungen 150ng und 200ng und den dazugehörigen NaCl-Transplantaten gelang weder auf RNA- noch Protein-Ebene ein deutlicher Nachweis von HBD-2 in den zu erwartenden

Epidermisstrukturen, so dass hierbei von experimentellen Umständen ausgegangen wird. Die geringe Anzahl der hier auswertbaren Präparate (150ng: 2 Präparate und 200ng: 1 Präparat) erschweren eine Interpretation des vorliegenden Ergebnisses zusätzlich.

### **5.3.3 HBD-3 nach Injektion von TNF- $\alpha$ und IFN- $\gamma$**

Nach Injektion von mittleren und hohen Dosierungen von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  weisen die Transplantate auf RNA-Ebene (ISH) eine verstärkte Expression von HBD-3 in Str. spinosum, basale und granulosum auf (s. Tab. 13 und 19, S. 48, 57, Abb. 11, S. 62, Abb. 16, 17, 22 und 23, S. 64 f). Diese Ergebnisse lassen sich auf Protein-Ebene (IHC) jedoch insgesamt in abgeschwächter Ausprägung bestätigen (s. Tab. 16 und 22, S. 53, 60, Abb. 11, S. 62, Abb. 28, 29, 34 und 35, S. 66 f). Hierfür könnte die Zeitspanne von 24 Stunden zwischen Zytokininjektion und Transplantatentnahme nicht ganz ausreichen, um eine vergleichbare Menge an HBD-3-Protein in vivo zu exprimieren. Die hier in vivo nachgewiesene zytokinvermittelte Expression von HBD-3 deckt sich insgesamt mit der in der Literatur beschriebenen Stimulierbarkeit von HBD-3 durch TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  in vitro.

Albanesi et al. (2007) und Nomura et al. (2003) gelang der Nachweis von HBD-3-RNA 24 Stunden nach Modulation primärer humaner Keratinozyten mit TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  in vitro. Zur Modulation verwendete Albanesi eine Menge von 20ng/ml IFN- $\gamma$  und variabel 20-50ng/ml TNF- $\alpha$ . Nomura hingegen verwendete die konstante Menge von 20ng IFN- $\gamma$  bzw. TNF- $\alpha$ . Ein positiver Nachweis von HBD-3 sowohl auf RNA- als auch Protein-Ebene gelang Sorensen et al. (2003) 48 Stunden nach in-vitro-Modulation, allerdings mit dem Zytokin TGF- $\alpha$ . Die erfolgreiche Menge betrug hier 50ng/ml TGF- $\alpha$ .

Der fehlende bzw. schwache Nachweis von HBD-3 nach einer Injektion von 250ng IFN- $\gamma$  ist bei nur einem durchgeführten Versuch eingeschränkt zu beurteilen.



#### **5.3.4 HBD-2 und HBD-3 nach Injektion von Zytokinkombinationen**

In den dieser Arbeit zugrunde liegenden Versuchen ließ sich die Expression von HBD-2 und HBD-3 nach Injektion einer Kombination der Zytokine TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  nicht beeinflussen (s. Tab. 22 und 23, Anlagen). Von einer synergistischen Wirkung, bei der die verwendeten Zytokindosierungen zu gleichen Teilen additiv wirken, kann bei Verwendung von Zytokinkombinationen nicht zwingend ausgegangen werden (Gläser et al. 2009).

Vergleicht man die Dosierungen, die sich in dieser Arbeit bei Einzelstimulationsversuchen in vivo als optimal erwiesen haben, sind die hier für Kombinationsversuche gewählten Dosierungen möglicherweise als nicht ausreichend einzustufen, auch wenn sie in den in-vitro- Untersuchungen von Albanesi et al. und Nomura et al. einen ausreichenden Effekt zeigten (2007, 2003). Angesichts der aufwändigen Versuchsdurchführung wurden keine weiteren Versuche mit Zytokinkombinationen anderer Dosierungen durchgeführt.

Die nachweisbare leichte Abschwächung der Expression von HBD-2 und HBD-3 nach Injektion einer Kombination von TNF- $\alpha$  und IL-13 auf der RNA-Ebene deckt sich mit den Angaben in der Literatur (Albanesi et al. 2007 und Nomura et al. 2003).

Angesichts der fehlenden Abschwächung der Expression von HBD-2 und HBD-3 auf Proteinebene könnte das gewählte Zeitfenster von 24 Stunden zwischen Injektion und Transplantatentnahme möglicherweise nicht ausreichen, um eine messbare Verringerung der AP nachzuweisen, da AP nach ihrer Bildung oft über mehrere Tage in der Haut bestehen bleiben. So ist z.B. das PSO-Protein nach seiner Bildung bis zu 7 Tage lang annähernd konstant in humaner Haut nachweisbar (Gläser et al. 2009).

#### **5.4 Fazit**

Zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Arbeit lagen keine Ergebnisse von in-vivo- Untersuchungen der AP HBD-2, HBD-3 und PSO am xenogenen SCID-Maus Transplantationsmodell mit der Modulation durch die Zytokine TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-13 vor. Somit konnte sich die Arbeit lediglich an vorausgegangenen in-vitro- Untersuchungen orientieren.

Mit einem Transplantationserfolg von über 80% wurde das xenogene SCID-Maus-Transplantationsmodell, welches im Rahmen dieser Arbeit erstmalig an der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Universität Leipzig angewendet wurde, erfolgreich etabliert und kann in weiterführenden Untersuchungen Verwendung finden.

Es ist gelungen, die Expression von AP sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene in der humanen Haut nach Transplantation nachzuweisen. Die Expression der untersuchten AP und deren Modulation mittels Zytokinen stellen sich in den durchgeführten Untersuchungen heterogen dar, sind in Summe jedoch mit den in der Literatur angegebenen Vorergebnissen vergleichbar.

Die niedrigsten gewählten Zytokinkonzentration in den durchgeführten Modulationsversuchen dieser Arbeit entsprachen den in vitro bereits als deutlich wirksam bestätigten (Nomura et al. 2003). Die gewählte Zeitspanne von 24 Stunden zwischen Zytokininjektion und Entnahme des Transplantates ist mehrfach für in-vitro-Untersuchungen als ausreichend zur Modulation der RNA-Expression von AP beschrieben (Albanesi et al. 2007 und Nomura et al. 2003).

Die aufwändige und lange Versuchsdurchführung von der Gewinnung der Spenderhaut, deren Transplantation auf die SCID-Maus bis zur histologischen Auswertung begrenzte den Umfang der durchführbaren Versuche und damit die Anzahl der zusammenfassbaren Ergebnisse.

Bei künftigen in-vivo-Arbeiten zu dieser Thematik mit dem xenogenen SCID-Maus-Transplantationsmodell sollten längere Zeitspannen zwischen Injektion des Zytokins und Transplantatentnahme sowie höher dosierte Zytokinmengen im Transplantat untersucht werden.

## 6 Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med.

Titel: **Die Expression antimikrobieller Peptide  
(Psoriasin, HBD-2 und HBD-3) in menschlicher Haut und  
deren Modulation in vivo - eine Untersuchung im xeno-  
genen Haut-Transplantationsmodell**

eingereicht von: Carl-Philipp Stavros Bürkle

angefertigt in der: Abteilung für experimentelle Dermatologie an der Klinik für  
Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Universität Leipzig

betreut von: Prof. Dr. med. Michael Sticherling

eingereicht am: 14. April 2011

Die Haut bildet die äußere Grenzfläche des menschlichen Körpers. Sie besitzt eine residente Hautflora und durch den Kontakt zur Umwelt werden stetig potentiell pathogene Mikroorganismen an sie herangetragen, welche die transiente Hautflora bilden. Unter der Annahme einer kontinuierlichen Vermehrung der vorhandenen mikrobiellen Erreger ist verwunderlich, dass die Oberfläche der gesunden Haut nicht exzessiv überwuchert wird. Eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung dieses relativen Gleichgewichts spielen die antimikrobiellen Peptide und eine Vielzahl weiterer Effektorzellen des Immunsystems.

Antimikrobielle Peptide kommen nicht nur in der menschlichen Haut vor, sondern lassen sich in den unterschiedlichsten Geweben des menschlichen Körpers nachweisen, wie z.B. in Herzmuskel, Flimmerepithel der Atemwege und den Derivaten des Knochenmarks. Sie stellen eine Gruppe kleiner cysteinreicher Peptide dar, die mit Hilfe ihrer positiven Ladung mit der negativ geladenen Membran von Bakterien interagieren und somit deren Zerfall herbeiführen können. Sie weisen ein breites Spektrum antimikrobieller Aktivität gegen grampositive und gramnegative

Bakterien sowie gegen Pilze auf. Antimikrobielle Peptide können zum einen konstitutiv im Gewebe vorkommen, zum anderen kann ihre Expression durch Modulation verstärkt werden. Die dafür verantwortlichen Mediatoren können auch nicht-bakteriellen Ursprungs sein. Dies legt die Beteiligung antimikrobieller Peptide am Krankheitsgeschehen chronisch entzündlicher Dermatosen nahe, wie z.B. des atopischen Ekzems und der Psoriasis. Zudem ist eine Beteiligung bestimmter antimikrobieller Peptide bei Zellwachstum und -differenzierung im Rahmen der Tumorgenese beschrieben.

In-vitro-Untersuchungen an humanen Keratinozytenkulturen bestätigen, dass die Zytokine  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IFN-}\gamma$  und insbesondere die Kombination beider Zytokine eine verstärkte Expression der antimikrobiellen Peptide humanes  $\beta$ -Defensin-2 (HBD-2) und humanes  $\beta$ -Defensin-3 (HBD-3) bewirken, während Interleukin-13 (IL-13) und IL-4 diese abschwächen.

Die Absicht dieser Arbeit war es, das Vorkommen der antimikrobiellen Peptide HBD-2, HBD-3 und Psoriasin (PSO) in menschlicher Haut vor und nach Transplantation auf NOD-SCID Mäuse und deren Modulation durch Zytokine in vivo zu untersuchen.

Hierzu wurde gesunde menschliche Haut paarweise auf den Rücken von NOD-SCID Mäusen transplantiert. Nach 8 bis 10 Wochen wurden die Zytokine  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IFN-}\gamma$  und IL-13 in unterschiedlicher Dosierung einzeln und in Kombination intradermal in die makroskopisch reizfreien Transplantate injiziert. Zu jeder Zytokininjektion erfolgte auf derselben Maus die Injektion physiologischer Kochsalzlösung 0,9%, welche als Negativkontrolle diente. 24 Stunden nach Applikation der Zytokine wurden die Versuchstiere narkotisiert und die Transplantate unmittelbar entnommen.

Die Expression von HBD-2, HBD-3 und PSO wurde auf RNA-Ebene mittels in-situ-Hybridisierung unter Verwendung hauseigener RNA-Sonden und auf Protein-Ebene mittels immunhistochemischer Nachweismethode unter Verwendung kommerzieller mono- und polyklonaler Antikörper untersucht. Anschließend erfolgten die mikroskopische Auswertung und fotografische Dokumentation.

Insgesamt wurden 76 humane Hautproben auf NOD-SCID Mäuse transplantiert. Davon wuchsen 64 Transplantate reizfrei an. Dies entspricht einer erfolgreichen Transplantationsquote von 84,2%.

Alle 3 untersuchten antimikrobiellen Peptide HBD-2, HBD-3 und PSO ließen sich auf RNA- und Protein-Ebene bei sehr ähnlicher Expression in der Spenderhaut vor und nach Transplantation nachweisen. In den Hauttransplantaten war HBD-2 in 20%, HBD-3 und PSO in je 60% der Fälle konstitutiv vorhanden. Die untersuchten antimikrobiellen Peptide ließen sich deutlich stärker in den oberen Epidermisschichten Stratum granulosum und spinosum als im tiefer gelegenen Stratum basale und Hautanhangsgebilden wie Schweißdrüsen und Haarfollikeln nachweisen.

Nach Injektion von TNF- $\alpha$  war eine erhöhte Expression von HBD-2, HBD-3 und PSO zu verzeichnen. Am effektivsten erwies sich für TNF- $\alpha$  die Dosis von 75 und 100ng. Die verstärkte Expression konnte für HBD-3 und PSO auf RNA- und Protein-Ebene, für HBD-2 nur auf der RNA-Ebene erfolgreich belegt werden.

Nach Injektion von IFN- $\gamma$  ließ sich eine erhöhte Expression von HBD-2 und HBD-3 aufzeigen. Für IFN- $\gamma$  erwies sich die Dosis von 100 und 150ng als besonders effektiv. Eine Erhöhung der Expression ließ sich für HBD-3 auf RNA- und Protein-Ebene, für HBD-2 auf der RNA-Ebene erfolgreich belegen. In den jeweils mitgeführten Positivkontrollen konnte HBD-2-Protein nachgewiesen werden. PSO zeigt auf Protein-Ebene nach der Modulation mit IFN- $\gamma$  eine bei höherer Dosierung (ab 150ng) leicht abnehmende Expression.

Eine Beeinflussung der Expression von HBD-2 und HBD-3 nach Injektion einer Zytokinkombination von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  konnte mit den gewählten Dosierungen von je 25 und 50ng auf RNA- und Protein-Ebene nicht nachgewiesen werden.

Ebenso ließ sich in den durchgeführten Modulationsversuchen mit einer Kombination von TNF- $\alpha$  (50ng) und IL-13 (125ng) weder auf RNA- noch auf Protein-Ebene eine eindeutige Änderung der Expression von HBD-2 und HBD-3 belegen.

Bei dem hier verwendeten Tierversuchsmodell handelt es sich um ein Pilotprojekt, in dessen Rahmen die angewendete Transplantationsmethode an der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Universität Leipzig etabliert wurde.

Die erzielten Transplantationsergebnisse zeigen, dass sich das xenogene Haut-Transplantationsmodell für in-vivo-Untersuchung von antimikrobiellen Peptiden in humaner Haut eignet. Der vermehrte Nachweis von HBD-2, HBD-3 und PSO in den oberen Epidermisschichten entspricht dem in der Literatur bestätigten physiologischen Verteilungsgradienten. Außerdem konnte belegt werden, dass die Expression von HBD-2, HBD-3 und PSO durch die Zytokine TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-13 unterschiedlich beeinflusst wird. Die in dieser Arbeit in vivo nachgewiesene positive Beeinflussung der Expression von HBD-2 und HBD-3 durch TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  entspricht den aus in-vitro-Untersuchungen bekannten Ergebnissen. Außerdem deckt sich die in vivo erzielte verstärkte Expression von PSO nach Modulation mit TNF- $\alpha$ , sowie die auf Protein-Ebene nachgewiesene Abschwächung nach Modulation mit IFN- $\gamma$  mit den in der Literatur beschriebenen in-vitro-Ergebnissen.

Die erzielten Ergebnisse vermitteln in ihrer Struktur einen teilweise exemplarischen Charakter, bestätigen aber dennoch die erfolgreiche Funktionsweise des Modells für die in-vivo-Modulation von antimikrobiellen Peptiden durch Zytokine in humaner Haut.

Im Rahmen zunehmender Resistenzen bei der Verwendung herkömmlicher Antibiotika könnte die klinisch gezielte Steuerung antibiotischer Peptide ein Lösungsansatz für die zunehmend eingeschränkte Handlungsfähigkeit bei der Behandlung bakteriell bedingter Infektionskrankheiten sein. Mikrobielle Erreger scheinen während der langen Zeit eines menschlichen Lebens keine Resistenzen gegen die mittels antibiotischer Peptide regulierten körpereigenen Abwehrmechanismen zu entwickeln. Weiterführende Untersuchungen könnten zu einem besseren Verständnis der Beteiligung antimikrobieller Peptide an chronisch entzündlichen Hauterkrankungen wie der Psoriasis oder dem atopischen Ekzem beitragen. Dies könnte dazu führen, dass deren Krankheitsverlauf, z.B. durch die medikamentöse Beeinflussbarkeit antibiotischer Peptide, möglicherweise zum Positiven verändert werden kann.

## **7 LITERATURVERZEICHNIS**

1. Abiko, Y., Suraweera, A.K., Nishimura, M., Arakawa, T., Takuma, T., Mizoguchi, I., Kaku, T. (2001): Differential expression of human beta-defensin 2 in keratinized and non-keratinized oral epithelial lesions; immunohistochemistry and in situ hybridization. *Virchows Arch.* 438: 248-253
2. Albanesi, C., Fairchild, H.R., Madonna, S., Scarponi, C., De Pita, O., Leung, D.Y.M., Howell, M.D. (2007): IL-4 and IL-13 negatively regulate TNF-alpha- and IFN-gamma-induced Beta-Defensin expression through STAT-6, suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1, and SOCS-3. *J. Immunol.* 179: 984–992
3. Algermissen, B., Sitzmann, J., Le Motte, P., Czarnecki, B., 1996: Differential expression of CRABP II, psoriasin and cytokeratin 1 mRNA in human skin diseases. *Arch. Dermatol. Res.* 8: 426-430
4. Ali, R.S., Falconer, A., Ikram, M., Bissett, C.E., Cerio, R., Quinn, A.G. (2001): Expression of the peptide antibiotics human  $\beta$ -defensin-1 and human  $\beta$ -defensin-2 in normal human skin. *J. Invest. Dermatol.* 117: 106-111
5. Antimicrobial Peptides Laboratory (BBCM) (21.05.2008):  
<http://www.bbcm.units.it/~antimic/researchDefensins.html>
6. Beutler, B., Hoebe, K., George, P. (2005): Genetic analysis of innate immunity: identification and function of the TIR adapter proteins. *Adv. Exp. Med. Biol.* 560: 29-39
7. Billingham, R.E., Medawar, P.B. (1951): The technique of free skin grafting in mammals. *J. Experimental Biology* 28: 385-402

8. Boehnke, W.H. (1999): The SCID-hu xenogenic transplantation model: complex but telling. *Arch. Dermatol. Res* 291: 367-373
  
9. Braun-Falco, O., Plewig, G., Wolff, H.H., Burgdorf, W.H.C., Landthaler, M. (2005): *Dermatologie und Venerologie* S. 27, 477, Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2005
  
10. De Jongh, G.J., Zeeuwen, P.L.J.M., Kucharekova, M., Pfundt, R., van der Valk, P.G., Blokk, W., Dogan, A., Hiemstra, P.S., van der Kerkhof, P.C., Schalkwijk, J. (2005): High expression levels of keratinocyte antimicrobial proteins in psoriasis compared with atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 125: 1163-1173
  
11. Di Nuzzo, S., Sylva-Steenland, R.M., Koomen, C.W., de Rie, M.A., Das, P.K., Bis, J.D., Teunissen, M.B. (2000): Exposure to UVB induces accumulation of LFA-1+ T cells and enhanced expression of the chemokine psoriasin in normal human skin. *Photochem. Photobiol.* 72: 374-382
  
12. Di Nuzzo, S., Sylva-Steenland, R.M., Koomen, C.W., Nakagawa, S., van Breemen, M., de Rie, M.A., Dasa, P.K., Bos, J.D., Teunissen, M.B.M. (2002): UVB Irradiation of Normal Human Skin Favors the Development of Type-2 T-cells In Vivo and in Primary Dermal Cell Cultures. *Photochemistry and Photobiology* 76(3): 301-309
  
13. Duits, L.A., Ravensbergen, B., Rademaker, M., Hiemstra, P.S., Nibbering, P.H. (2002): Expression of  $\beta$ -defensin 1 and 2 mRNA by human monocytes, macrophages and dendritic cells. *Immunology* 106: 517-525
  
14. Enerbäck, Ch., Porter, D.A., Seth, P., Sgroi, D., Gaudet, J., Weremowicz, S., Morton, C.C., Schnitt, S., Pitts, R.L., Stampf, J., Barnhart, K., Polyak, K. (2002): Psoriasin expression in mammary epithelial cells in vitro and in vivo. *Cancer Research* 62: 43-47



15. Fearon, D.T., Locksley, R.M. (1996): The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 272: 50-53
16. Feng, Z., Dubyak, G.R., Ledermann, M.M., Weinberg, A. (2006): Cutting edge: human beta defensin 3 – a novel antagonist of HIV-1 coreceptor CXCR4. *J. Immunol.* 177: 782-786
17. Gallo, R.L., Huttner, K.M. (1998): Antimicrobial peptides: An emerging concept in cutaneous biology. *J. Invest. Dermatol.* 111: 739-743
18. Gamblicher, T., Skrygan, M., Huyn, J., Bechara, F.G., Sand, M., Altmeyer, P., Kreuter, A. (2006): Pattern of mRNA expression of beta-defensins in basal cell carcinoma. *MBC cancer* 6: 163
19. Garcia, J.R.C., Krause, A., Schulz, S., Rodriguez-Jimenez, F.J., Klüver, E., Adermann, K., Forssmann, U., Frimpong-Boateng, A., Bals, R., Forssmann, W.G. (2001): Human  $\beta$ -defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *The FASEB Journal* 15: 1819-1821
20. Gläser, R., Harder, J., Lange, H., Bartels, J., Christophers, E., Schröder, J.M. (2005): Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from *Escherichia coli* infection. *Nat. Immunol.* 6: 57-64
21. Gläser, R., Meyer-Hoffert, U., Harder, J., Cordes, J., Wittersheim, M., Kobliakova, J., Fölster-Holst, R., Proksch, E., Schröder, J.M., Schwarz, T. (2009): The antimicrobial protein psoriasin (S100A7) is upregulated in atopic dermatitis and after experimental skin barrier disruption. *J. Invest. Dermatol.* 129: 641-649
22. Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., Schröder, J.M. (1997): A peptide antibiotic of human skin. *Nature* 387: 861

23. Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., Schröder, J.M. (2001): Isolation and characterization of human  $\beta$ -defensin, a novel human inducible peptide antibiotic. *J. Biol. Chem.* 276: 5707-5713
24. Hoffmann, H.J., Olsen, E., Etzerodt, M., Madsen, P., Thøgersen, H.C., Kruse, T., Celis, J.E. (1994): Psoriasin binds calcium and is upregulated by calcium to levels that resemble those observed in normal skin. *J. Invest. Dermatol.* 103: 370-375
25. Kersting, M.R., Sudhoff, H., Hasler, R.J., Nieberler, M., Pautke, C., Wolff, K.D., Wagenpfeil, S., Al-Benna, S., Jacobsen, F., Steinstraesser, L. (2009): Psoriasin (S100A7) up-regulation in oral squamous cell carcinoma and its relation to clinicopathologic features. *Oral. Oncol.* 45 (8): 731-736
26. Kisich, K.O., Howell, M.D., Boguniewicz, M., Heizer, H.R., Watson, N.U., Leung, D.Y. (2007): The constitutive capacity of human keratinocytes to kill *Staphylococcus aureus* is dependent on beta-defensin 3. *J. Invest. Dermatol.* 127: 2368-2380
27. Lehrer, R.I., Ganz, T. (2002): Defensins in vertebrate animals. *Curr. Opin. Immunol.* 14: 96-102
28. Howell, M.D., Boguniewicz, M., Pastore, S., Novak, N., Girolomoni, G., Leung, D.Y. (2006): Mechanism of HBD-3 deficiency in atopic dermatitis. *Cl. Immunology.* 121: 332-338
29. Matsuzaki, K. (1999): Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim. Biophys. Acta* 1462: 1-10
30. Moubayed, N., Weichenthal, M., Harder, J., Wandel, E., Sticherling, M., Gläser, R. (2007): Psoriasin (S100A7) is significantly up-regulated in human epithelial skin tumors. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 133: 253-261

31. Nickoloff, B.J., Kunkel, S.L., Burdick, M., Strieter, R.M. (1995): Severe combined immunodeficiency mouse human psoriatic skin chimeras – validation of a new model. *Am. J. Pathol.* 146: 580-588
  
32. Noble, W.C. (1989): Skin of the normal and immune compromised host. *Curr. Probl. Dermatol.* 18: 37-41
  
33. Nomura, I., Goleva, E., Howell, M.D., Quatyba, A.H., Ong, P.Y., Hall, C.F., Darst, M.A., Gao, B., Boguniewicz, M., Travers, J.B., Leung, D.Y.M. (2003): Cytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes. *Immunol* 171: 3262-3269
  
34. Olsen, E., Rasmussen, H.H., Celis, J.E. (1995): Identification of proteins that are abnormally regulated in differentiated cultured human keratinocytes. *Electrophoresis* 16: 2241-2248
  
35. Ong, P.Y., Ohtake, T., Brandt, C., Strickland, I., Boguniewicz, M., Ganz, T., Gallo, R.L., Leung, D.Y.M. (2002): Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N. Engl. J. Med* 347: 1151-1160
  
36. Ostergaard, M., Wolf, H., Orntoft, T.F., Celis, J.E. (1999): Psoriasin (S100A7): A putative urinary marker for the follow-up of patients with bladder squamous cell carcinomas. *Electrophoresis* 20: 349-354
  
37. Petersson, S., Bylander, A., Yhr, M., Enerbäck, Ch. (2007): S100A7 (Psoriasin), highly expressed in Ductal Carcinoma In Situ (DCIS), is regulated by IFN-gamma in mammary epithelial cells. *BMC Cancer* 2007, 7: 205
  
38. Quinones-Mateu, M., Ledermann, M. M., Feng, Z., Chakraborty, B., Weber, J., Rangel, H. R., Marotta, M.L., Mirza, M., Jiang, B., Kiser, P., Medvik, K., Sieg, S. F., Weinberg, A. (2003): Human epithelial (beta)-defensin 2 and 3 inhibit HIV-1 replication. *AIDS* 17: 39-48

39. Raj, P.A., Dentino, A.R. (2002): Current status of defensins and their role in innate and adaptive immunity. *FEMS Microbiol. Letters* 206: 9-18
40. Sawamura, D., Goto, M., Shibaki, A., Akiyama, M., McMillan, J.R., Abiko, Y., Shimizu, H. (2005): Beta defensin-3 engineered epidermis shows highly protective effect for bacterial infection. *Gene Therapy* 12: 857-861
41. Schneider, J.J., Unholzer, A., Schaller, M., Schäfer-Korting, M., Korting, H.C. (2005): Human defensin. *J. Mol. Med.* 83: 587-595
42. Schröder, J.M. (2002): Antimikrobielle Peptide: Effektormoleküle der Haut als Abwehrorgan. *Der Hautarzt* 53: 424-435
43. Selsted, M.E., Szklarek, D., Lehrer, R.I. (1984): Purification and antibacterial activity of antimicrobial peptides from rabbit granulocytes. *Infect. Immun.* 45: 150-154
44. Selsted, M.E., Harwig, S.S.L., Ganz, T., Schilling, J.W., Lehrer, R.I. (1985): Primary structures of three human neutrophil defensins. *J. Clin. Invest.* 76: 1436-1439
45. Shai, Y. (1999): Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta* 1462: 55-70
46. Sorensen, O.E., Cowland, J.B., Theilgaard-Mönch, K., Liu, L., Ganz, T., Borregard, N. (2003): Wound healing an expression of antimicrobial peptides/polypeptides in human keratinocytes, a consequence of common growth factors. *J. Immunol.* 170: 5583-5589

47. Steiner, H., Hultmark, D., Engstrom, A., Bennich, H., Borman, H.G. (1981): Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* 292: 246-248
48. Steinstraesser, L., Oezdogan, Y., Wang, S.C., Steinau, H.U. (2004): Host defense peptides in burns. *Burns* 30: 619-627
49. Thatis, K., Lee, F.T., Wheatley, J.M., Garin-Chesa, P., Park, J.E., Smyth, F.E., Obata, Y., Stockert, E., Hall, C.M., Old, L.J., Rettig, W.J., Scott, A.M. (2003): Expression and Targeting of Human Fibroblast Activation Protein in a Human Skin/Severe Combined Immunodeficient Mouse Breast Cancer Xenograft Model. *Mol. Can. Therapeutics* 2: 729-737
50. Takizawa, Y., Saida, T., Tokuda, Y., Dohi, S., Wang, Y.L., Urano, K., Ueyama, Y. (1996): Nex immunodeficient (nude-scid, beige-scid) mice as excellent recipients of human skin grafts containing intraepidermal neoplasms. *Arch. Dermatol. Res.* 289: 213-218
51. Tavakkol, A., Zouboulis, C.C., Duell, E.A., Voorhees, J.J. (1994): A retionic-acid inducible skin-specific gene (RIS-1/psoriasin): molecular cloning and analysis of gene expression in human skin in vivo and cultured skin cells in vitro. *Mol. Biol. Rep.* 20: 75-83
52. Weinberg, A., Quinones-Mateu, M.E., Lederman, M.M. (2006): Role of human beta-defensins in HIV infection. *Adv. Dent. Res.* 19: 42-48
53. Yan, H.C., Juhasz, I., Pilewski, J.M., Murphy, G.F., Herlyn, M., Albelda, S.M. (1993): Human/severe combined immunodeficient mouse chimeras: an experimental in vivo model system to study the regulation of human endothelial cell-leukocyte adhesion molecules. *J. Clin. Invest.* 91: 986-996

54. Yan, H.C., Delisser, H.M., Pilewski, J.M., Barone, K.M., Szklut, P.J., Chang, X.J., Ahem, T.J., Langer-Safer, P., Albelda, S.M. (1994): Leukocyte recruitment into human skin transplanted onto severe combined immunodeficient mice induced by TNF-alpha is dependent on E-Selectin. *J. Immunol.* 152: 3053-3063
55. Yang, L., Weiss, T.M., Lehrer, R.I., Huang, H.W. (2000): Crystallization of antimicrobial pores in membranes: magainin and protegrin. *Biophys. J.* 79: 2002-2009
56. Yoshihiro, A., Anura, K.S., Michiko, N., Toshiya, A., Taishin, T., Itaru, M., Tohru, K. (2001): Differential expression of human beta-defensin 2 in keratinized and non-keratinized oral epithelial lesions; immunohistochemistry and in situ hybridization. *Virchows Arch.* 438: 248-253
57. Zasloff, M. (1987): Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84: 5449-5453
58. Zasloff, M. (2002): Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415: 389-395
59. Zhao, C., Wang, I., Lehrer, R.I. (1996): Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. *FEBS Letters* 396: 319-322

## 8 ANLAGEN

HBD-2 – ISH und IHC	ISH			IHC	
	TNF- $\alpha$ + IFN- $\gamma$	25+25ng	50+50ng	25+25ng	50+50ng
	Haut- strukturen	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl
	Str. corneum	Nbb	0	0	0
		0	0	0	0
	Str. granulosum	Nbb	0	0	0
		0	0	0	0
	Str. spinosum	Nbb	0	0	0
		0	0	0	0
	Str. basale	Nbb	0	0	0
		0	0	0	0
	Infiltrat	Nbb	0	0	0
		0	0	0	0
	Endothel	Nbb	0	0	0
		0	0	0	0
	Schweißdrüsen	Nbb	0	0	0
		0	0	0	0
	Haarfollikel	Nbb	0	0	0
		0	0	0	0
	<b>N Hautproben:</b>	1 *	2	1	2
	Anmerkungen:	* : keine Epidermis im TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ -Transplantat			

Tab. 22 Nachweis von **HBD-2** im Transplantat **nach Injektion mit TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$**  (ISH und IHC).

+: schwach; ++: mäßig; +++: stark; f: fokal; 0: negativ; nbb: nicht beurteilbar.

HBD-3 – ISH und IHC	ISH			IHC	
	TNF- $\alpha$ + IFN- $\gamma$	25+25ng	50+50ng	25+25ng	50+50ng
	Haut- strukturen	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl
	Str. corneum	Nbb	0	0	0
		0	0	0	0
	Str. granulosum	Nbb	+	++	+
		0	0 - +	++	0
	Str. spinosum	Nbb	+	++	0
		0	+	++	+
	Str. basale	Nbb	0	0	0
		0	0	0	0
	Infiltrat	Nbb	0	0	0
		0	0	0	0
	Endothel	Nbb	0	0	0
		0	0	0	0
	Schweißdrüsen	Nbb	0	na	na
		0	0	na	na
	Haarfollikel	Nbb	0	na	na
		0	0	na	na
	<b>N Hautproben:</b>	1 *	2	1	2
	Anmerkungen:	* : keine Epidermis im TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ - Transplantat			

Tab. 23 Nachweis von **HBD-3** im Transplantat **nach Injektion mit TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$**  (ISH und IHC).

+: schwach; ++: mäßig; +++: stark; f: fokal; 0: negativ; na: Struktur in Präparat nicht vorhanden; nbb: nicht beurteilbar.



	HBD-2		HBD-3	
	ISH	IHC	ISH	IHC
<b>TNF-<math>\alpha</math> + IL-13</b>	<b>50+125ng</b>	<b>50+125ng</b>	<b>50+125ng</b>	<b>50+125ng</b>
<b>Hautstrukturen</b>	<b>NaCl</b>	<b>NaCl</b>	<b>NaCl</b>	<b>NaCl</b>
Str. corneum	0	0	0	0
	0	0	0	0
Str. granulosum	0	0	0 - +	0 - +/f++
	0 - ++	0	0 - +++	0
Str. spinosum	0 - +	0	0 - ++	0 - +/f++
	0 - +++	0	0 - +++	0 - +/ f++
Str. basale	0	0	0 - +	0
	0 - +	0	0 - ++	0
Infiltrat	0	0	0	0
	0	0	0	0
Endothel	0	0	0	0
	0	0	0	0
Schweißdrüsen	0 - na	0	0 - na	0 - na
	0 - ++	0	0 - na	0 - na
Haarfollikel	0 - na	0	0 - na	0 - na
	0 - ++	0	0 - na	0 - na
<b>N Hautproben:</b>	4 *	4 *	4 *	4 *
Anmerkungen:	* : keine Epidermis in einem TNF- $\alpha$ /IL-13 – Transplantat			

Tab. 24 Nachweis von **HBD-2 und HBD-3** im Transplantat **nach Injektion mit TNF- $\alpha$  und IL-13** (ISH und IHC). +: schwach; ++: mäßig; +++: stark; f: fokal; 0: negativ; na: Struktur in Präparat nicht vorhanden.

Tab. 25 Transplantationsdaten

Humanhauttransplantate auf SCID - Mäusen

Anzahl	Maus-Nr.	Geburtstag	OP-Tag	Gewicht OP	Transpl.	Modulator	[c]/microliter	Menge/ ulites	Injekt.-Tag	Status	Status
1	100	28.11.03	04.03.04	27,9g	# 1 NH	TNF-alpha	50ng/ml	50	21,1g	11.05.04	gut
2	99	28.11.03	27.04.04	26,3g	# 2	TNF-alpha	50ng	50	24,4g	30.06.04	gut
3	119	20.01.04	30.04.04	21,2g	# 3 SH	INF-gamma	50ng	50	22,5g	01.07.04	0
4	120	21.01.04	30.04.04	25,1g	# 3	TNF-a/INF-g	50ng/50ng	50	25,3g	01.07.04	gut
5	132	29.01.04	06.05.04	22,1g	# 4 SH	TNF-alpha	50ng	50	23,0g	07.07.04	gut
6	133	29.01.04	06.05.04	21,5g	# 4	INF-gamma	50ng	50	22,3g	07.07.04	gut
7	150	12.02.04	06.05.04	28,8g	# 4	TNF-a/INF-g	25ng/25ng	50	26,8g	07.07.04	gut
8	830	13.01.04	06.05.04	22,3g	# 4	TNF-a/INF-g	50ng/50ng	50	23,3	07.07.04	gut
9	147-1	12.02.04	11.05.04	16,9g	# 5 SH	~	~	~	~	~	0 *
10	148	12.02.04	11.05.04	20,0g	# 5	~	~	~	~	~	0 *
11	149	12.02.04	11.05.04	21,9g	# 5	~	~	~	~	~	0 *
12	163	16.02.04	11.05.04	28,0g	# 5	~	~	~	~	~	0 *
13	850	28.01.04	03.06.04	23,7g	# 6 NH	TNF-a/IL-13	50ng/125ng	50	22,6g	03.08.04	gut
14	836	15.01.04	03.06.04	26,3g	# 6 NH	TNF-a/IL-13	50ng/125ng	50	24,7g	03.08.04	gut
9	147-2	12.02.04	09.06.04	20,5g	# 7 NH	TNF-a/IL-13	50ng/125ng	50	21,0g	22.09.04	gut
15	106	15.12.03	09.06.04	31,3g	# 7 NH	TNF-a/IL-13	50ng/125ng	50	29,8g	22.09.04	gut
16	158	14.02.04	25.06.04	30,5g	# 8 NH					8.7. Verstorben	8.7. Verstorben
10	148-2	12.02.04	29.06.04	19,4g	# 9 NH	TNF-alpha	75ng	75	20,0g	21.10.04	gut
11	149-2	12.02.04	29.06.04	20,4g	# 9 NH	TNF-alpha	75ng	75	21,2g	21.10.04	gut
17	93	16.11.03	08.07.04	21,9g	# 10 SH	TNF-alpha	100ng	75	20,4g	21.10.04	gut
18	144	06.02.04	08.07.04	23,9g	# 10 SH				22,6g		Verstorben
19	115	30.11.03	08.07.04	24,9g	# 10 SH	TNF-alpha	100ng	75	25,1g	21.10.04	gut
20	91	16.11.03	08.07.04	24,0g	# 10 SH					~	0 *
21	266	01.08.04	19.10.04	21,1g	# 11SH	TNF-alpha	75ng	100	26,3g	20.12.04	gut
22	267	01.08.04	19.10.04	18,8g	# 11SH	TNF-alpha	100ng	100	25,6g	20.12.04	gut
23a	268	01.08.04	22.10.04	28,0g	# 12NH	TNF-alpha	150ng	100	30,1g	20.12.04	gut
23b	268				# 12NH	TNF-alpha	150ng	100			gut
24	234	15.06.04	22.10.04	22,6g	# 12NH	INF-gamma	100ng	100	25,6g	10.03.05	gut
12a	163-2	16.02.04	25.10.04	26,9g	# 14NH				28,3g		Verstorben
12b	163-2										Verstorben
20a	91-2	16.11.03	26.10.04	24,4g	# 13NH	TNF-alpha	200ng	100	25,6g	20.12.04	gut
20b	91-2					TNF-alpha	200ng	100			gut
25a	270	09.08.04	01.11.04	22,3g	# 15SH	INF-g	100ng	100	26,1g	20.12.04	gut
25b	270					INF-g	100ng	100			gut
26a	269	01.08.04	01.11.04	28,5g	# 15SH	INF-g	150ng	100	29,4g	20.12.04	gut
26b	269					IFN-g	150ng	100			gut
27	271	09.08.04	30.11.04	22,3g	# 16NH	IFN-g	150ng	100	22,7g	10.03.05	gut grTRA
28	277	03.11.04	02.12.04	22,0g	# 17NH	IFN-g	250ng	100	30,9g	10.03.05	gut

SH = Spalthaut

NH = Normalhaut

0 \* = 2. Transplantation stattgefunden

grTRA= großes rechteckiges Transplantat

## **Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

14-04-2011

Datum

Gerb Philipp Tzsch

Unterschrift

## LEBENS LAUF

---

In Online-Veröffentlichung gelöscht.

**In Online-Veröffentlichung gelöscht.**

## **DANKSAGUNG**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die dem Zustandekommen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. med. M. Sticherling danke ich für die Bereitstellung des Themas, sein persönliches Engagement und die stetige wissenschaftliche Betreuung auch nach seinem Wechsel zur Hautklinik des Universitätskinikums Erlangen.

Frau Dr. rer. nat. E. Wandel danke ich für die intensive Unterstützung und die Bereitschaft mir jederzeit mit wissenschaftlichem Rat zur Seite zu stehen.

Herrn Prof. Dr. med. J. C. Simon danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Forschungslabor der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie an der Universität Leipzig.

Bei allen technischen Mitarbeitern des dermatologischen Labors (insbesondere Britt Rosin, Annett Majok und Heidi Gedicke) die mir ständig und geduldig zur Seite standen, möchte ich mich für deren große Hilfe bedanken.

Bei Frau H. Scholz möchte ich mich für die stetige organisatorische Unterstützung im Rahmen der Transplantationsarbeiten und die gute Betreuung der Versuchstiere im MEZ Leipzig bedanken.

Danken möchte ich meiner Familie und allen Freunden, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit kontinuierlich unterstützt haben.